

Projectnummer: 772.025.02
Projecttitel: Gendoping en overige DNA technologie bij landbouwhuisdieren: Verkenning van huidige stand van zaken en toekomstige onderwerpen
Projectleider: Dr.ir. G.A. Kleter

Rapport 2009.005

juni 2009

Gentechnologie bij landbouwhuisdieren

G.A. Kleter, M.J. Groot, S.J. Hiemstra¹, B.P.H. Peeters⁴, M.A. Smits¹, E.H. van der Waaij³, D.F.M. van de Wiel², H. Woelders¹ *

* Behalve de eerstgenoemde auteur, zijn de familienamen van de overige auteurs op alfabetische volgorde weergegeven. De auteurs hebben allen een inhoudelijke bijdrage aan het rapport geleverd, waarnaast de eerstgenoemde auteur ook een redactionele bijdrage heeft geleverd.

Business Unit: Veiligheid & Gezondheid
Cluster: Databanken, Risicoschatting & Ketenmanagement

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Wageningen Universiteit en Researchcentrum
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Tel 0317 480 256
Fax 0317 417 717
Internet www.rikilt.wur.nl

¹**ASG Veehouderij**
Wageningen Universiteit en Researchcentrum
²**ASG Genetica**
Wageningen Universiteit en Researchcentrum
³**Leerstoelgroep Adaptatiefysiologie**
Wageningen Universiteit en Researchcentrum
⁴**Centraal Veterinair Instituut**
Wageningen Universiteit en Researchcentrum

Copyright 2008, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) *dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) *dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) *de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Het onderzoek beschreven in dit rapport is gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Thema Dierbehandelingsmiddelen, Programma voor Wettelijke en Ondersteunende Taken.

Verzendlijst:

- Drs. G.A. Lam (VWA)
- Overige leden begeleidingscommissie WOT thema 3: Ing. E.J.R. Maathuis (LNV-DK), Prof. dr. U.H.T. Brinkman (VU), Dr. L. van Ginkel (RIVM), G.E. Kolkman (AID), Dr. A.L.J. Nielen (LNV-VD), Drs. B.W. Ooms (VWA-BuR), Ir. M.L. de Groot (AID), A.J.G. van der A (VWA)
- J.A. van Rhijn VWA
- Dr. R. Theelen (LNV)
- Dr. H.P.J.M. Noteborn (VWA)
- Dr. B.A.J. Roelen (Celbiologisch en reproductielaboratorium, Universiteit Utrecht)
- Dr. D.A. Bleijs (Bureau GGO, VROM, RIVM)
- Dr. J.E.N. Bergmans (Bureau GGO, VROM, RIVM)

Bij de totstandkoming van dit rapport is de grootst mogelijke zorgvuldigheid betracht. Tenzij vooraf schriftelijk anders overeengekomen aanvaardt RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid geen aansprakelijkheid voor schadeclaims die worden uitgebracht n.a.v. de inhoud van dit rapport.

Samenvatting

Dit rapport geeft een overzicht van de ontwikkelingen van het kloneren van landbouwhuisdieren door somatische celkerntransfer en genetische modificatie met het oog op de mogelijke consequenties hiervan op beleid en regelgeving. Op dit moment zijn er nog geen genetisch gemodificeerde voedseldieren in de handel. Wel zijn er al medicijnen op de markt die uit de melk van genetisch gemodificeerde dieren gezuiverd worden. De verwachting is dat op korte termijn de eerste genetische gemodificeerde voedseldieren buiten de Europese Unie op de markt zullen komen, met name snelgroeiende kweekvis. Later zullen mogelijk ook andere gekloneerde en/of genetisch gemodificeerde zoogdieren volgen, zowel voor voedselproductie als voor productie van non-food.

Versillende technieken kunnen gebruikt worden om dieren te kloneren en/of genetisch te modificeren, zoals transgenese, genterapie, DNA vaccinatie, en RNA-interferentie (RNAi). Kenmerkend voor al deze technieken is dat zij het mogelijk maken om “vreemde” genetische informatie in te brengen in een gastheer, hetzij tijdelijk hetzij permanent. Er zijn diverse methoden om deze wijzigingen op te sporen, waarbij de detectie soms bemoeilijkt wordt door de alleen zeer locale aanwezigheid van het vreemde DNA, de gelijkenis tussen nieuw en gastheereigen materiaal, en de soms tijdelijke aard van de modificaties. Dit heeft mogelijke consequenties voor beleid en regelgeving. Om voorbereid te zijn op de toekomstige ontwikkelingen, onder andere de spoedig verwachte marktintroductie van genetisch gemodificeerde dieren buiten de Europese Unie, zijn de volgende aanbevelingen gedaan (in het kort samengevat):

- Een voorstel voor een eenduidige definitie wanneer een kloon van een landbouwhuisdier (verkregen door somatische celkerntransfer) moet worden beschouwd als genetisch gemodificeerd organisme;
- Een identificatie van mogelijke “blinde vlekken” in nationale en internationale regels ten aanzien van klonering en genetische modificatie bij landbouwhuisdieren;
- Een inventarisatie van mogelijke positieve en negatieve consequenties van homogener dierpopulaties door klonering;
- Een verkenning van de mogelijkheden voor detectie van individuele dieren in een populatie van gekloneerde dieren of afstammelingen daarvan;
- Het volgen van ontwikkelingen op het gebied van klonering en genetische modificatie wereldwijd plus het ontwerpen van detectiemethoden die geschikt zijn voor herkenning van toepassing van deze ontwikkelingen;
- Toetsing van anti-gendoping maatregelen (o.a. detectie, controle) in de humane sport voor hun toepasbaarheid op vergelijkbare toepassingen van gentechnologie (o.a. productieverhoging) bij landbouwhuisdieren;
- Ondersteunen van het ontwikkelen van detectiemethoden door het aanleggen van een database met daarin mRNA en eiwitexpressie profielen van gezonde en behandelde dieren, plus het uitvoeren van een inventarisatie van genen die kunnen bijdragen aan de kwaliteit en/of kwantiteit van het dierlijke eindproduct.

Summary

This report aims at providing an overview of the developments in cloning by somatic cell nucleus transfer and in genetic modification of domestic livestock. This is done with a view on the potential consequences of these developments on policy and legislation. At this moment, there are no genetically modified food animals on the market yet. Nonetheless, there are, for example, medicines that are purified from the milk of genetically modified animals. The expectations are that, in the short term, the first genetically modified food animals will come to the market outside the European Union, particularly genetically modified, rapidly growing fish from aquaculture. Possibly later, other cloned and/or genetically modified animals are expected to follow suit, both for food and non-food production. Various techniques can be used for cloning and genetic modification of animals, such as transgenesis, gene therapy, DNA vaccination, and RNA interference (RNAi). A typical feature of all these techniques is that they enable the introduction of “foreign” genetic information into a host, either temporarily or permanently. Various methods to trace these modifications exist, whilst the detection is occasionally hampered by the local introduction of the foreign DNA, the similarity between foreign and host-proprietary materials, and the sometimes temporary nature of the modifications. This will also bear its consequences on policy and legislation. In order to be prepared for future developments, including the shortly awaited market introduction of genetically modified animals outside the European Union, the following recommendations have been formulated, summarized in brief here:

- A proposal for an unequivocal definition as to when a clone of a domestic livestock animal (obtained through somatic cell nucleus transfer) should be considered a genetically modified organism;
- An identification of other potentially “blind spots” in national and international rules regarding cloning and genetic modification in domestic animals;
- An inventory of potential positive and negative consequences of more homogenous animal populations obtained through cloning;
- An exploration of the possibilities for detection of individual animals in a population of cloned animals or their progeny;
- The scrutiny of developments in the area of cloning and genetic modification on a global scale plus the design of detection methods that are suitable for the recognition of these developments being put into practice;
- An examination of anti-gene-doping measures (such as detection and control) in human sports for their applicability to comparable uses of gene technology (such as production enhancement) in domestic animals;
- Support to the development of detection methods by the establishment of a database containing mRNA and protein expression profiles of healthy and treated animals, plus an inventory of genes that can contribute to the quality and quantity of animal end products.

Voorwoord

Het auteursteam wil langs deze weg nogmaals zijn dank betuigen aan de Voedings en Waren Autoriteit voor het financieel mogelijk gemaakt hebben van de "desk-research" en het schrijven van het rapport. Ook willen de auteurs de verschillende collega's die het concept rapport van hun nuttige commentaren hebben voorzien hiervoor danken, waaronder Drs. B.W. Ooms (VWA), Dr. M. Gerretsen (Wageningen Universiteit), Ir. J.D. van Klaveren (RIKILT), Dr.ir. R.F.M. van Gorcom (RIKILT) en Prof.dr. M.W.F. Nielen (RIKILT/Wageningen Universiteit).

Inhoudsopgave

| | |
|---|-----------|
| Samenvatting | 3 |
| Summary | 4 |
| Voorwoord | 5 |
| 1 Introductie | 9 |
| 2 Technisch-wetenschappelijke achtergrond..... | 11 |
| 2.1 Inleiding..... | 11 |
| 2.2 DNA modificatie technologieën..... | 12 |
| 2.2.1 Somatische celkern transfer..... | 12 |
| 2.2.1.1 Kloneren..... | 12 |
| 2.2.1.2 Procedure en succes ratio..... | 12 |
| 2.2.1.3 Stamcellen..... | 13 |
| 2.2.1.4 Stamcellen en gentherapie..... | 14 |
| 2.2.1.5 Detectie van gekloneerde dieren of producten ervan..... | 14 |
| 2.2.2 Recombinant DNA, transgenese, gentherapie, DNA vaccins en RNAi..... | 14 |
| 2.2.2.1 Inleiding..... | 14 |
| 2.2.2.2 Methoden van DNA transfer..... | 15 |
| 2.2.2.3 Transgenese..... | 17 |
| 2.2.2.4 Gentherapie..... | 19 |
| 2.2.2.5 DNA vaccinatie..... | 19 |
| 2.2.2.6 RNA-interferentie..... | 20 |
| 2.2.2.7 Detectie van producten van recombinant DNA technieken..... | 20 |
| 3 Mogelijke impact van gentechnologie op veehouderij, fokkerij, veterinaire praktijk, dierwelzijn en -gezondheid | 22 |
| 3.1 Mogelijke impact van klonering door somatische celkerntransfer..... | 22 |
| 3.2 Mogelijke impact van transgene dieren..... | 24 |
| 3.3 Mogelijke impact van gentherapie en DNA vaccins..... | 26 |
| 4 Genetische technieken bij dieren versus gendoping bij mensen | 29 |
| 4.1 Kwantiteit..... | 29 |
| 4.2 Kwaliteit..... | 30 |
| 4.3 Mogelijke toepassing bij dieren van strategieën voor detectie van gendoping bij mensen..... | 31 |
| 4.3.1 Structurele verschillen tussen eiwitten geproduceerd door transgenen..... | 31 |
| 4.3.2 Immunrespons tegen virale vectoren..... | 32 |
| 4.3.3 Gen-expressie profilering (transcriptie profilering)..... | 32 |
| 4.3.4 Eiwit profilering (proteomics)..... | 32 |
| 4.3.5 DNA barcodes..... | 33 |
| 4.3.6 Polymerase kettingreactie (PCR)..... | 33 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3.7 | Cel biosensors | 33 |
| 4.3.8 | Multiplex immuno PCR fingerprint | 33 |
| 5 | Nationaal veiligheidsbeleid en regelgeving..... | 35 |
| 5.1 | Huidig beleid en regelgeving..... | 35 |
| 5.1.1 | Regelgeving van klonering door somatische celkerntransfer | 35 |
| 5.1.2 | Regelgeving van - en verplichtingen voor - recombinant DNA technologie bij landbouwhuisdieren | 36 |
| 5.1.2.1 | Transgene dieren..... | 36 |
| 5.1.2.2 | Getherapie en DNA vaccins | 37 |
| 5.1.2.3 | Regelgeving voor genetisch gemodificeerd voedsel en diervoeders..... | 38 |
| 5.2 | Mogelijke consequenties voor veiligheidsbeleid en regelgeving | 39 |
| 6 | Toekomstige ontwikkelingen | 42 |
| 6.1 | Achtergrond..... | 42 |
| 6.1.1 | Internationale harmonisering van de regelgeving..... | 42 |
| 6.1.2 | EU regelgeving..... | 43 |
| 6.2 | Verwachte ontwikkelingen | 43 |
| 7 | Aanbevelingen | 47 |
| 8 | Literatuur..... | 49 |
| Annex I | Overzicht van de EU-wetgeving over GGO's..... | 61 |

1 **Introductie**

Aanleiding voor het schrijven van dit rapport is het overleg geweest over een verkennend onderzoek naar “gendoping” bij landbouwhuisdieren tussen de onderzoekers, de Voedsel- en Waren Autoriteit en de begeleidingscommissie van het thema 3, “dierbehandelingsmiddelen,” voor de Wettelijk en Ondersteunende Taken (WOT) van het RIKILT – Instituut voor Voedselveiligheid. Er is namelijk gebleken dat, op basis van de voortgang in moderne biotechnologie bij dieren en berichten in de media over de mogelijkheden van gendoping in de sport, er een behoefte bestaat om de mogelijke toepassingen van moderne biotechnologie bij landbouwhuisdieren in kaart te brengen. Dit rapport heeft tot doel in deze behoefte te voorzien en om onder andere de mogelijke consequenties voor het beleid en regelgeving ten aanzien van toelating en controle van deze technieken zichtbaar te maken.

Genetische modificatie, oftewel het gebruik van technieken waarmee op niet-natuurlijke wijze erfelijk materiaal bij een nieuwe gastheer kan worden ingebracht, is een moderne vorm van biotechnologie. Het heeft in de landbouw en voedselproductie al sinds medio jaren '90 toepassingen gevonden. Bekende voorbeelden hiervan zijn de commerciële teelt van genetische gemodificeerde gewassen, die wereldwijd op 125 miljoen hectare geteeld werden in 2008, en het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen voor de productie van enzymen en dergelijke in gesloten eenheden, zoals fermentoren in fabriekshallen. De ontwikkelingen op dit gebied zijn snel verlopen, rekening houdende met onder andere het feit dat de eerste grootschalige introductie van commerciële genetisch gemodificeerde gewassen pas in 1996 heeft plaatsgevonden.

Ook bij landbouwhuisdieren zijn er verschillende veelbelovende ontwikkelingen op het gebied van moderne biotechnologie gaande. Deze ontwikkelingen betreffen onder andere de genetische modificatie van dieren, waaronder de introductie van erfelijke eigenschappen, maar ook genterapie en DNA vaccins, alsmede klonering door transfer van somatische celkernen. Deze technieken zullen in de volgende hoofdstukken nader worden toegelicht. Terwijl veel van deze moderne biotechnologische toepassingen in dieren momenteel nog in de experimentele fase zijn, is de verwachting dat deze binnenkort ook gecommercialiseerd zullen worden. Een voorbeeld van een dergelijk pre-commercieel product is genetisch gemodificeerde kweekzalm met verbeterde groei-eigenschappen waardoor deze efficiënter geproduceerd kunnen worden. Deze zalm, waarvoor een aanvraag voor toelating in de Verenigde Staten is ingediend, zou daar naar verwachting rond 2010 op de markt kunnen komen. Een dergelijke aanvraag is nog niet in Europa ingediend. In Nederland is er desalniettemin brede ervaring met gebieden die dit werkveld raken of deels bestrijken, zoals genetisch gemodificeerde proefdieren, humane genterapie, en genetisch gemodificeerde vaccins.

Naast legale toepassingen zijn er ook illegale toepassingen denkbaar met het doel de productie van landbouwhuisdieren te vergroten, vergelijkbaar met humane sportdoping. Er valt hierbij te denken aan extra spiergroei door groeihormoon, IGF-I of myostatine transgene productiedieren, maar ook aan gekloonde sportpaarden en honden of dieren met genen die de bespiering regelen, de bloedproductie of de zuurstofcapaciteit van het bloed verhogen, en genen die de pijnperceptie modificeren (Filipp, 2007).

Gezien de implicaties voor het beleid van de introductie van deze nieuwe technologieën beoogt het rapport de volgende vragen te beantwoorden:

- Welke technieken zijn er en welke toepassingen zijn hiermee mogelijk?
- Welke ontwikkelingen worden verwacht?
- Welke risico's en positieve effecten voor de voedselkwaliteit, volksgezondheid, diergezondheid, dierenwelzijn, milieu, fokkerij en landbouwkundige praktijk zijn hiermee verbonden?
- Waar liggen de knelpunten voor het beleid en toezicht/handhaving (risicomanagement)?
- Over welke handhavinginstrumenten (detectie en wetgeving) beschikt de Nederlandse overheid of zou zij moeten kunnen beschikken?
- Welke aanbevelingen kunnen op basis van het bovenstaande gedaan worden?

De methodiek die voor het samenstellen van dit rapport is gevolgd bestaat uit het verzamelen van wetenschappelijke gegevens over de stand van zaken van moderne biotechnologie bij dieren en de vooruitzichten voor toepassingen ervan in de nabije toekomst. Het rapport vat derhalve de resultaten samen van het verzamelen van data, inclusief een verkenning van de wetenschappelijke literatuur en, indien nodig, ook van grijze informatiebronnen met niet-“peer-reviewed” gegevens die betrouwbaar geacht worden. De biotechnologische technieken die gekozen zijn voor dit onderzoek op basis van recente ontwikkelingen betreffen i) klonering door somatische celkerntransfer, ii) genetische modificatie door recombinant DNA technieken, iii) genterapie, en iv) DNA vaccins. Deze technieken zullen in het volgende hoofdstuk nader toegelicht worden. Van deze technieken worden verschillende aspecten door het rapport beschouwd, waaronder de stand van zaken, de toekomstige ontwikkelingen, de regelgeving voor het gebruik van deze technieken, de mogelijkheid om het gebruik van deze technieken te detecteren, en de mogelijke consequenties van het gebruik van deze technieken op de veehouderij, fokkerij, veterinaire praktijk, dierenwelzijn en diergezondheid.

2 Technisch-wetenschappelijke achtergrond

2.1 Inleiding

De toepassing van moderne biotechnologie bij landbouwhuisdieren kan een breed veld omvatten. Het huidige rapport concentreert zich op moderne biotechnologische technieken die veranderingen in het erfelijk materiaal in de dieren zelf teweeg brengen. Deze technieken veroorzaken hiermee “genetische modificatie” in de strikte zin zoals door de EU regelgeving gedefinieerd. Richtlijn 2001/18/EC voor de milieu-introductie van genetisch gemodificeerde organismen (GGO’s, zie Annex 1) definieert genetische modificatie technieken, inclusief de volgende technieken:

- Recombinant nucleïnezuur technieken, waarmee nieuw genetisch materiaal in een gastheerorganisme kan worden ingebracht dat niet van nature hierin voorkomt;
- Rechtstreeks inbrengen van buiten het organisme gemaakt erfelijk materiaal, bijvoorbeeld door micro-injectie;
- Fusie van cellen met niet-natuurlijke methoden die tot nieuwe combinaties van erfelijk materiaal uit die cellen leiden.

Somatische celkern transfer klonering wordt ook in dit rapport betrokken, omdat dit onder het tweede punt van rechtstreeks inbrengen van erfelijk materiaal kan vallen, afhankelijk van de interpretatie hiervan door nationale en EU overheden. Momenteel is een discussie in de Europese politiek gaande of producten die afkomstig zijn van nakomelingen van dieren die door somatische celkern transfer gekloneerd zijn wel of niet in de EU verordening voor nieuwe voedingsmiddelen dienen te worden opgenomen.

Naast genetische modificatie zijn er andere vormen van moderne biotechnologie bij landbouwhuisdieren die buiten de focus van het huidige rapport vallen. Een voorbeeld hiervan is het gebruik van DNA markers, met andere woorden “barcodes” uit het erfelijk materiaal die specifiek in dieren met wenselijke eigenschappen aanwezig of actief zijn, bij fokkerijprogramma’s. Deze markers kunnen bij analyse van het totale DNA van een dier zichtbaar gemaakt worden zodat hun aanwezigheid herkend wordt. Andere voorbeelden zijn het gebruik van “omics” benaderingen waarbij op niet-specifieke wijze een grote verzameling erfelijke gegevens, eiwitten of chemische verbindingen die door het metabolisme gevormd worden tegelijk in kaart worden gebracht (respectievelijk “genomics,” proteomics,” en “metabonomics”). Deze “omics” technieken kunnen helpen inzicht te krijgen in welke veranderingen er optreden onder bepaalde condities zonder dat vooraf de identiteit van elke geteste substantie vast hoeft te staan.

Naast deze diagnostische hulpmiddelen zijn er ook ontwikkelingen op het gebied van therapeutische middelen, bijvoorbeeld recombinant vaccins. Een dergelijk vaccin kan bestaan uit een specifiek eiwit van een ziekteverwekkend micro-organisme dat door een ander genetisch gemodificeerd (“recombinant”) organisme in grote hoeveelheden wordt aangemaakt met verminderd risico op aanwezigheid van andere pathogene factoren van het donororganisme in het preparaat. Ook andere biologische diergeneesmiddelen zijn in de wetenschappelijke literatuur beschreven, zoals het gebruik van recombinant antilichamen tegen een bepaald doelwit antigeen, die voor “passieve immunisering” kunnen worden toegepast door toediening aan het te beschermen dier. Daarnaast worden ook verzwakte

levende pathogenen, zoals *Salmonella typhimurium*, gebruikt als drager voor recombinante vaccins en DNA vaccins. Evenals de niet-verzwakte vorm zijn deze pathogenen in staat in de gastheer (mens, dier) een immuunrespons op te roepen. Echter, het vermogen om infecties en ziektes op te wekken hebben deze verzwakte pathogenen verloren.

In het onderstaande hoofdstuk worden voor elk van de verschillende technieken van genetische modificatie die bij landbouwhuisdieren kan worden toegepast de volgende punten samengevat:

- De stand van zaken van de techniek;
- De bereikte en verwachte resultaten;
- De risico's voor dierwelzijn diergezondheid (NB risico's voor voedselveiligheid worden later apart besproken);
- Welke regelgeving is van toepassing op de techniek; en
- Welk knelpunten zijn er met betrekking tot het bovenstaande.

2.2 DNA modificatie technologieën

2.2.1 *Somatische celkern transfer*

2.2.1.1 Kloneren

Klonering wordt vaak in één adem genoemd met genetische modificatie. Dit is echter onterecht. Bij genetische modificatie gaat het om het gericht veranderen van genetische informatie en bij kloneren gaat het om het kopiëren van bestaande genetische informatie.

Een kloon kan worden gedefinieerd als een genetisch identieke nakomeling van één ouder. Klonering wordt al heel lang toegepast bij planten (stekken, enten). Het kloneren van zoogdieren is een ontwikkeling van de laatste decennia. Embryosplitsing is de meest klassieke vorm hiervan. Moderne technieken maken echter gebruik van kerntransplantatie. Hierbij wordt de kern van een (somatische) cel ingebracht in een eicel (waaruit de oorspronkelijke kern is verwijderd), die vervolgens wordt ingebracht in de baarmoeder van een draagmoeder. Op deze manier ontstaat een nakomeling met erfelijk materiaal afkomstig van één ouder. In 1997 publiceerden Wilmut en collega's (1997) de succesvolle toepassing van somatische celkern transplantatie bij schapen en werd het kloon-schaap Dolly geboren. Intussen is deze techniek bij een groot aantal verschillende dieren toegepast, waaronder muizen, ratten, honden, katten, geiten, koeien, varkens, paarden en apen. Recente overzichtsartikelen over klonen zijn te vinden in onder andere de referenties van Vajta en Gjerris (2006) en Campbell en collega's (2005).

2.2.1.2 Procedure en succes ratio

De standaardprocedure voor kerntransplantatie bestaat uit een aantal stappen:

- Het verwijderen van de kern uit geïsoleerde eicellen;
- Het inbrengen van de donorkern (of cel) in de lege eicel;
- Het activeren van het gereconstrueerde embryo;
- Een korte kweek van het embryo in de reageerbuis; en
- De transplantatie van het embryo naar de baarmoeder van een "gesynchroniseerde" draagmoeder.

De succes ratio van de standaardprocedure is nog relatief laag. Er treedt nog veel verlies op tijdens de embryonale en foetale ontwikkeling (Campbell et al., 2005). Daarnaast is gebleken dat veel van de gekloneerde dieren niet helemaal gezond zijn en/of afwijkingen vertonen. De volgende factoren zijn hier debet aan:

- Het gebruik van minder geschikte donorcellen en/of ontvanger eicellen;
- Suboptimale synchronisatie tussen de celcyclus fasen van donorkern en ontvanger cytoplasma;
- Schade toegebracht tijdens de behandeling van donor en ontvangercellen (mechanische, osmotische, toxische en thermische schade);
- Genetische veranderingen in het DNA van de somatische cel; en
- De “herprogramming” van het genoom van de donorcelkern verloopt niet goed. In somatische cellen kunnen genen langdurig worden aan- of uitgeschakeld door “imprinting.” Dit gebeurt tijdens differentiatie van cellen. Onder normale omstandigheden wordt de differentiatie-specifieke imprinting bij de aanleg van geslachtscellen weer “gewist” en wordt er een maternale en paternale geslachtscel-specifieke imprinting aangebracht. Na kerntransplantatie moet de eicel daarom de imprinting van de genen van de somatische celkern in overeenstemming brengen met die van een beginnend embryo.

2.2.1.3 Stamcellen

In het humaan biomedisch onderzoek wordt experimenteel “therapeutisch kloneren” toegepast. Bij therapeutisch kloneren wordt met behulp van kerntransplantatie een ca. 100-cellig embryo gekweekt dat genetisch identiek is aan de patiënt. Uit het embryo worden vervolgens embryonale stamcellen geïsoleerd. Dit zijn zogenaamde multi- of pluripotente cellen die onbepaald kunnen delen en die zorgen voor de aanmaak van gespecialiseerde cellen. Door de kweekomstandigheden te variëren, kunnen stamcellen uitgroeien tot verschillende celtypen. Deze cellen kunnen vervolgens bij patiënten geïmplant worden om deze te genezen van een bepaalde ziekte (stamceltherapie). De patiënt ontvangt dus cellen die genetisch identiek zijn aan zijn eigen lichaamscellen. Het betreft hierbij ziekten en afwijkingen die het gevolg zijn van een verstoorde celfunctie of van beschadigd weefsel. Stamcelonderzoek vindt vooral plaats bij mensen, muizen en ratten. Ondanks intensief onderzoek, is het tot nu toe niet gelukt om embryonale stamcellen te kweken van varkens, runderen en schapen (Renard et al., 2007; Keefer et al., 2007). Bij de kip zijn er wel positieve ontwikkelingen in die richting (Van de Lavoie en Mather-Love, 2006; Horiuchi et al., 2006).

Bij muizen is aangetoond dat ook bepaalde weefsels van volwassen dieren stamcellen bevatten. Deze cellen zijn waarschijnlijk nodig om bepaalde weefsels (bijvoorbeeld darmepitheel) voortdurend te “verversen” met nieuwe cellen. Er worden steeds meer van deze adulte stamcellen ontdekt, ook bij mensen. Sommige adulte stamcellen lijken zo flexibel te zijn dat ze zich onder bepaalde omstandigheden in meerdere richtingen kunnen ontwikkelen en/of differentiëren. Het onderzoek naar multipotente adulte stamcellen bij landbouwhuisdieren staat nog in de kinderschoenen (Zeng et al., 2006; Motlík et al., 2007). Bij landbouwhuisdieren is er speciale belangstelling voor adulte stamcellen waaruit mannelijk geslachtscellen ontstaan. (Dobrinski, 2007; Dobrinski and Travis, 2007). Genetische modificatie en transplantatie van zulke stamcellen schept de mogelijkheid om transgeen sperma en transgene dieren te produceren zonder gebruik te hoeven maken van embryonale stamcellen (die voor de meeste landbouwhuisdieren nog niet beschikbaar zijn, zie hierboven).

2.2.1.4 Stamcellen en gentherapie

Een belangrijke ontwikkeling in het kader van dit rapport is de mogelijkheid om (embryonale of adulte) stamcellen in vitro te kweken en deze genetisch te modificeren door het inbrengen van (soortvreemd) DNA (zie 2.2.2.3 en 2.2.2.4). Als dit DNA wordt ingebracht in (menselijke) cellen in het kader van een geneeskundige behandeling, bijvoorbeeld voor het herstel van een defect endogeen gen, dan spreekt men over gentherapie. Hiervoor worden genetisch gemodificeerde stamcellen na in vitro selectie en in vitro kweek weer terug geplaatst in patiënten (zie 2.2.2.4). De kernen van genetisch gemodificeerde stamcellen kunnen ook, net zoals de kernen van andere cellen worden toegepast voor kerntransplantatie naar lege eicellen waardoor genetisch gemodificeerde klonen (= transgene dieren) ontstaan (zie 2.2.2.3).

2.2.1.5 Detectie van gekloneerde dieren of producten ervan

De detectie van gekloneerde dieren of producten ervan is in principe alleen mogelijk als de identiteit van de donor en/of acceptor bekend zijn. Bij klonering door middel van kerntransplantatie wordt er een nieuwe combinatie gemaakt van het chromosomale (kern) DNA van de donor en het mitochondriële DNA van de acceptor. Aangezien het mitochondriële DNA van verschillende individuen niet identiek is zouden deze verschillen gebruikt kunnen worden om het gekloneerde dier te onderscheiden van de donor. Echter, indien de identiteit van de donor of acceptor niet bekend is, is dit niet mogelijk. Het is daarentegen wel mogelijk om klonen van verschillende donoren van elkaar te onderscheiden op basis van DNA patronen, terwijl ook hiervoor geldt dat individuele klonen mogelijk niet van elkaar kunnen worden onderscheiden.

Het DNA van gekloneerde dieren is voor het overgrote deel gelijk aan niet-gekloneerde dieren, maar het is theoretisch waarschijnlijk dat er somatische mutaties optreden die door “sequencing” op te sporen zouden kunnen zijn. Het MHC-complex bijvoorbeeld, wat een belangrijke functie heeft in het immuunsysteem, zou een mogelijke plaats zijn waar zulke mutaties op te sporen zouden kunnen zijn. Dit is echter kostbaar onderzoek.

Een ander probleem is het onderscheid aantonen tussen een dier uit een kloon en een “gewoon” dier. Er is op dit moment nog weinig inzicht in hoe dat aan te tonen zou kunnen zijn, maar bij het maken van een kloon uit een somatische cel wordt het DNA gedemethyleerd, een soort herprogramming, totdat het weer een cel is waar een nieuw organisme uit kan groeien. Het zou kunnen zijn dat het methylatie patroon van een cel van een gekloneerd dier er structureel anders uit ziet dan van een cel van een niet-gekloneerd dier. Dit zou een aanknopingspunt kunnen zijn voor een kloon identificatietest.

2.2.2 *Recombinant DNA, transgenese, gentherapie, DNA vaccins en RNAi*

2.2.2.1 Inleiding

Zestig jaar geleden ontdekte Oswald Avery dat het DNA-molecuul de drager is van erfelijke eigenschappen. In 1953 ontdekte James Watson en Francis Crick de dubbele-helixstructuur van het DNA. De verzameling technieken die het mogelijk maakt om “in de reageerbuis” stukken DNA aan elkaar te koppelen en vervolgens te vermeerderen, staat bekend als de recombinant-DNA-technologie. In 1973 slaagden onderzoekers er voor het eerst in om stukjes vreemd DNA in te bouwen in een cirkelvormig DNA-molecuul van een bacterie. Dit “gerecombineerde” DNA molecuul kon door bacteriën worden vermeerderd. Vanaf dat moment kon in principe elk stuk DNA van ieder organisme

worden geïsoleerd en vermeerderd. Hierdoor werd het mogelijk om de structuur (basenvolgorde) van allerlei genen op te helderen en om deze gericht te veranderen (mutageniseren). Later werden methoden ontwikkeld om DNA in de reageerbuis te vermenigvuldigen (Polymerase Chain Reaction, PCR). De technologische ontwikkelingen binnen het (recombinant) DNA onderzoek verlopen de laatste jaren stormachtig, met name door een hoge graad van automatisering en de ontwikkeling van “high throughput” technologieën. Illustratief zijn de nieuwe generatie DNA-sequencers (Roche 454, Solexa, SOLiD) waarmee recent de structuur van het hele humane genoom van James Watson binnen twee maanden werd opgehelderd (Wolinsky, 2007). Ook voor het rund en de kip zijn momenteel de eerste “genoom drafts” in het publieke domein beschikbaar (Hubbard et al., 2007) en die van het varken volgt in 2008 (Humphray et al., 2007). Een andere illustratie van de enorme stroomversnelling die dit onderzoek meemaakt is de beschikbaarheid van zogenaamde DNA microarrays waarmee de expressie van 20.000 genen tegelijk kan worden gemeten. Binnen het “life sciences” onderzoek treedt er een shift op van “recombinant DNA onderzoek” (gericht op één of enkele genen) naar “genomics” onderzoek (gericht op het hele genoom).

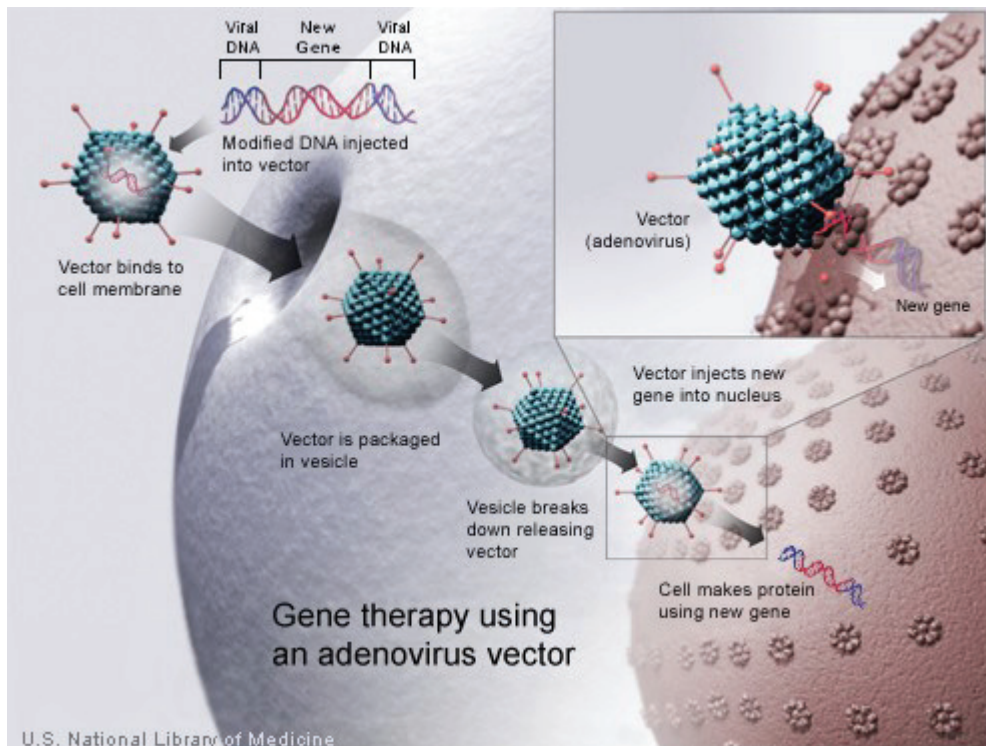
2.2.2.2 Methoden van DNA transfer

Er worden verschillende technieken gebruikt voor de overdracht (transfer) van DNA naar cellen. Deze technieken kunnen onderverdeeld worden in drie categorieën: 1) transfectie met behulp van biochemische methoden; 2) transfectie met behulp van fysische methoden, en 3) transductie met behulp van virale vectoren. Er wordt hierbij onderscheid gemaakt tussen transiënte transfectie (het toegevoegde DNA wordt niet geïntegreerd in het genoom van de ontvangende cel en is maar tijdelijk aanwezig) en stabiele transfectie (het toegevoegde DNA wordt stabiel geïntegreerd in het genoom van de ontvangende cel en blijft permanent aanwezig). Transiënte transfectie wordt toegepast om een tijdelijke verhoogde expressie van het desbetreffende DNA element te bewerkstelligen. Bij de stabiele transfectie wordt het genoom van de ontvangende cel permanent gewijzigd. De overdracht van DNA kan in vivo plaatsvinden naar lichaamscellen (somatische cellen) of geslachtscellen (ei- en spermacellen) en in vitro naar geslachtscellen, gekweekte (primaire) cellijnen of stamcellen. De belangrijkste DNA transfer technieken zijn: 1) Lipide-gemedieerde methode (Lipofectamine Reagent); 2) Calcium-fosfaat methode; 3) DEAE-dextraan methode; 4) Polybrene/DMSO methode; 5) Electroporatie (met behulp van elektrische pulsen); 6) Laser-gemedieerde methode; 7) Temperatuurschok methode; 8) Microinjectie van naakt DNA; 9) Injectie van naakt DNA; 10) "Bombardement" met DNA-gecoate micropartikels (“gene gun”); en 11) Met behulp van virale vectoren. Sommige technieken zijn beter geschikt voor DNA transfers naar in-vitro gekweekte cellen (1-8); andere technieken zijn juist ontwikkeld voor in vivo toepassingen (9-11).

Virale vectoren

Virussen hebben de natuurlijke eigenschap om hun genoom in eukaryotische cellen te brengen en het daar te vermenigvuldigen. Ze worden daarom veelvuldig als vehikel gebruikt om “vreemde” genen een cel binnen te brengen. Het binnen brengen van vreemde genen in een cel via virale vectoren wordt transductie genoemd. Er zijn veel verschillende virale vectoren ontwikkeld. De belangrijkste zijn de retrovirale vectoren [inclusief de vectoren op basis van lentivirussen (HIV)], vectoren gebaseerd op adenovirussen of adeno-geassocieerde virussen en vectoren op basis van herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Alle virale vectoren zijn zodanig veranderd dat ze niet meer kunnen repliceren in normale cellen maar nog heel goed in staat zijn om een ingebouwd gen een eukaryotische cel binnen te loodsen. Sommige vectoren hebben een beperkte “DNA capaciteit,” anderen daarentegen kunnen zeer grote

DNA fragmenten cellen binnen loodsen (HSV-1). De meeste virale vectoren zijn ontwikkeld om een grote verscheidenheid aan cellen te infecteren (adenovirus; Figuur 1). Er zijn echter ook vectoren met een hoge mate van celspecificiteit. Sommige vectoren (retrovirus) kunnen alleen cellen transduceren die actief delen, andere vectoren (lentivirus, adenovirus) kunnen zowel delende als niet-delende cellen infecteren.



Figuur 1 Gentherapie met behulp van een adenovector. Een nieuw gen is ingebouwd in de adenovector die gebruikt wordt om het DNA in de kern van de cel af te leveren. Het nieuwe gen kan een functioneel eiwit aanmaken.¹

In het algemeen worden er aan virale vectoren een aantal eisen gesteld met betrekking tot veiligheid, toxiciteit, genetische stabiliteit en celspecificiteit. Veiligheid wordt meestal bewerkstelligd door het inactiveren van de replicatie functie. Zulke vectoren hebben helper sequenties nodig om zich te kunnen vermenigvuldigen (voor productiedoeleinden). Soms kunnen ze alleen repliceren in specifieke cellen waarin "replicatie helper functies" zijn ingebouwd. Een ander veiligheidsaspect heeft te maken met het vermogen van sommige virussen (retrovirussen, inclusief lentivirussen) om random te integreren in het genoom van hun gastheercellen. Zo'n integratie kan leiden tot de novo oncogenese (Nienhuis, 2006; Nienhuis et al., 2006). Dit aspect is minder belangrijk als het gaat om het modifieren van cellen die niet meer actief delen, bijvoorbeeld neuronen. Genoom integratie leidt in het algemeen tot een betere lange termijn expressie. Sommige vectoren, waaronder adenovectoren, worden juist toegepast omdat ze niet integreren in het genoom van geïnfecteerde cellen.

¹ Figuur afkomstig van de "Genetics Home Reference" (National Library of Medicine) zoals gepubliceerd op 30 januari 2009 op <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/therapyvector>

Bij in vivo toepassingen is het van belang dat virale vectoren genetisch stabiel zijn omdat instabiliteit een negatieve impact heeft op de voorspelbaarheid en reproduceerbaarheid van hun toepassing en omdat het gevaar bestaat dat door recombinatie actieve virus partikels kunnen ontstaan. Daarnaast is het van belang dat virale vectoren slechts een minimaal effect op de fysiologie van hun target cellen hebben en dat ze een minimale immunrespons oproepen. Het elimineren van geïnfecteerde cellen door (anti-retrovirale of anti-adenovirus) immunresponsen kan nadelig zijn voor de in vivo genexpressie en kan tot klinische problemen leiden.

Een groot aantal virale vectoren is tot nu toe gebruikt in zowel laboratorium als (experimenteel) klinisch onderzoek. Elke vector heeft zijn eigen voordelen en beperkingen. Dit is de reden waarom er voor de verschillende doeleinden zo veel verschillende vectoren gebruikt worden. Voor recente overzichten van het gebruik van virale vectoren voor genterapeutische behandelingen zie bijvoorbeeld Mancheño-Corvo en Martín-Duque (2006) en Mandel en collega's (2007). Virale vectoren worden niet alleen toegepast voor genterapeutische doeleinden maar ook als vector voor verschillende vaccins. Hierbij worden specifieke antigen-producerende genen van een bepaalde ziekteverwekker met behulp van een virale vector toegediend en door de vector vervolgens in doelcellen/weefsels gebracht op een wijze die veel op de initiële fase van een natuurlijke virusinfectie lijkt, maar waarbij niet de nadelige effecten door virusverspreiding optreden. Na het inbrengen van de virale vector in cellen wordt door het aflezen van het erfelijk materiaal van het virus het bedoelde antigeen aangemaakt. Meestal gaat het hierbij om een transiente (tijdelijke) expressie. Het immuunsysteem herkent deze producten als "vreemd" antigeen waardoor een specifieke immunrespons wordt geïnduceerd tegen de ziekteverwekker en/of cellen die geïnfecteerd zijn met deze ziekteverwekker. Zie onder andere Reyes-Sandoval en collega's (2007) en Dudek en Knipe (2006) voor meer details hierover.

DNA vectoren

Voor de transfer van naakt DNA wordt in de regel gebruik gemaakt van een DNA vector. Vaak heeft een vector de vorm van een circulair stuk DNA (een plasmide). Voor grotere DNA fragmenten wordt gebruik gemaakt van zogenaamde cosmiden die in bacterievirussen "ingepakt" kunnen worden. Daarnaast zijn artificiële chromosomen ontwikkeld, eerst van bacteriën (BAC's), later van gist (YAC's) en recent ook van de mens (HAC's). Zulke HAC's bezitten enkele kenmerken die ze heel attractief maken voor gebruik bij genterapie (Ren et al., 2006). HAC's gedragen zich als normale chromosomen en hun DNA capaciteit is enorm. Dit biedt de mogelijkheid om transgenen tot expressie te brengen in een genetische omgeving die identiek is aan hun oorspronkelijke chromosomale omgeving. DNA-transfers met behulp van HAC's leiden niet tot DNA integratie maar tot autonome replicatie zodat er geen gevaar is voor de novo oncogenese. HAC's kunnen eenvoudig met behulp van microinjectie in de pro-nucleus van eencellige embryo's gebracht worden, maar er zijn ook andere manieren om met HAC's transgene dieren te ontwikkelen. Kuroiwa en collega's (2002) bijvoorbeeld introduceerden HAC's met het complete locus van de humane lichte en zware immunoglobuline genen in fibroblasten van koeien die vervolgens gebruikt werden voor kerntransplantatie. Het transgene nageslacht produceerde humane immunoglobulinen in hun bloed.

2.2.2.3 Transgenese

De eerste transgene muizen werden al in 1975 geproduceerd. In 1985 werden de eerste transgene varkens en schapen geboren. De tabel (Tabel 1) laat een aantal mijlpalen zien van transgenese bij dieren.

Om transgene dieren te verkrijgen (met het transgen in alle cellen, inclusief geslachtscellen) is het noodzakelijk om exogeen DNA toe te voegen tijdens het ééncellig stadium van het embryo (zygoot). Er worden hiervoor verschillende methoden gebruikt. De belangrijkste zijn: 1) het injecteren van naakt DNA in de pronucleus van een eicel; 2) kerntransplantatie van genetische gemodificeerde (stam)cellen naar “lege eicellen” (zie 2.2.1); 3) via sperma gemedieerde DNA transfer (zaadcellen hebben de eigenschap om exogeen DNA te binden, het te internaliseren en het over te brengen naar oöcyten tijdens de bevruchting; 4) het gebruik van ex vivo geproduceerd transgeen sperma.

Tabel 1 Belangrijke mijlpalen uit de geschiedenis van transgenese bij dieren ²

| Jaar | Mijlpaal |
|------|---|
| 1985 | Transgene varkens en schapen |
| 1986 | Embryo klonering door kerntransfer in schapen |
| 1991 | Transgeen melkvee (onder andere stier Herman) |
| | Transgene schapen die veranderde melk produceren |
| 1992 | Transgene varkens die resistent zijn tegen virale infectie |
| 1994 | Varkens die een remmer van het humane complement systeem produceren |
| 1997 | Somatische klonering door celkerntransfer in schapen (Dolly) |
| | Transgene landbouwhuisdieren als een model voor humane ziekte |
| 1998 | Transgeen rundvee geproduceerd door celkerntransfer |
| 2000 | Transgene schapen geproduceerd door het gericht inbrengen van genen |
| 2001 | “Ecologisch correcte” transgene varken |
| 2002 | Productie van biologische polymervezel door transgene cellen |
| | Kalf met humaan kunstchromosoom |
| 2003 | Transgeen melkvee dat gewijzigde melkeiwitten produceert |
| | Complete gen inactivatie in varkens |
| 2004 | Sequentiële inactivatie van twee genen in runderen |
| 2005 | Transgene koe die resistent is tegen bacteriële infectie (mastitis) |

Er kunnen drie soorten transgenese uitgevoerd worden: 1) het toevoegen van genetische informatie aan de bestaande erfelijke informatie, 2) het inactiveren van bestaande genen (knock-out mutanten), 3) het modificeren van de expressie van specifieke genen (“knock down” mutanten, RNAi technologie, zie 2.2.2.6). Er zijn transgene dieren ontwikkeld voor tal van toepassingen, onder andere de productie van humane eiwitten ten behoeve van de farmaceutische industrie (bijvoorbeeld humane factor X in schapenmelk); de modificatie van dierlijke producten (bijvoorbeeld verhoogde caseïne gehalte in koemelk of knock-out van beta-lactoglobuline om hypoallergene melk te verkrijgen); het verwijderen van specifieke antigenen in varkens ten behoeve van xenotransplantatie; het inactiveren van specifieke genen (bijvoorbeeld prion gen in muizen, schapen en koeien) ten behoeve van onderzoek aan dierziekten; het toevoegen van genen om de gevoeligheid voor dierziekten te reduceren (bijvoorbeeld

² Deze tabel is een aangepaste versie van tabel 1 van Melo en collega's (2007)

mastitis, influenza, TGEV), het toevoegen van groeihormonen voor verhoogde groeisnelheid en voerconversie, het toevoegen van plantaardig desaturase voor de productie van vlees met een hoger gehalte aan niet-verzadigde vetzuren, het toevoegen van een bacterieel fytase om de fosfaat uitstoot van varkens te reduceren, enzovoorts. De meeste knock-out dieren (muizen) zijn ontwikkeld ten behoeve van het fundamenteel wetenschappelijk onderzoek.

2.2.2.4 Gentherapie

Gentherapie is het genezen van aandoeningen met een genetische oorzaak door specifiek genetisch materiaal in te brengen in het DNA van een ziek individu. In theorie is het mogelijk om zowel somatische cellen als geslachtscellen genetisch te veranderen door het inbrengen van exogeen DNA. Bij de mens zijn tot nu toe alle gentherapie experimenten gericht op somatische cellen. Gentherapie van somatische cellen kan onderverdeeld worden in twee categorieën: 1) *ex vivo*, hierbij worden somatische cellen of stamcellen genetisch gemodificeerd buiten het lichaam en na selectie teruggeplaatst in het lichaam; 2) *in vivo*, hierbij worden cellen in het lichaam direct gemodificeerd. Voor beide methoden zijn verschillende DNA transfer methoden beschikbaar (zie 2.2.2.2). Er worden verschillende methoden toegepast om een defect gen door middel van gentherapie te vervangen of te repareren: een normale vorm van het gen kan in het genoom geïntegreerd worden op een niet specifieke locatie; het abnormale gen kan vervangen worden door de normale vorm door middel van homologe recombinatie; het abnormale gen kan gerepareerd worden door gerichte mutagenese; en de expressie van het abnormale gen kan uitgeschakeld worden. De toepassing van gentherapie stuit nog op een aantal problemen, 1) het effect van gentherapie, zeker bij delende somatische cellen, is meestal van korte duur, 2) integratie van het transgen op een verkeerde plek in het genoom kan tumoren veroorzaken, 3) inductie van ongewenste immuun responsen die het effect van de therapie reduceren, 4) inductie van toxische effecten en ontstekingsreacties vooral bij gebruik van virale vectoren, 5) gentherapie is vooral geschikt voor genetische aandoeningen gebaseerd op één enkel defect gen en veel minder voor multifactoriële genetische aandoeningen, 6) er zijn belemmeringen op basis van ethische en religieuze overwegingen. Desalniettemin zijn er inmiddels een aantal succesvolle gentherapieën gerapporteerd, waaronder die voor het verhelpen van ernstig gecompromitteerde immuundeficiëntie (Severely Compromised Immunodeficiency, SCID; referentie Cavazzano-Calvo et al., 2004).

2.2.2.5 DNA vaccinatie

DNA vaccinatie is een experimentele techniek om organismen te beschermen tegen infectieziekten door het inspuiten van naakt DNA in spierweefsel. Hiervoor wordt eerst een gen van een ziekteverwekker in de reageerbuis vermeerderd. Na vaccinatie nemen spiercellen het DNA op en zijn ze in staat om het antigeen waarvoor het DNA codeert te produceren. Het immuunsysteem herkent het product als een “vreemd” antigeen waardoor een specifieke immuun respons wordt geïnduceerd tegen de desbetreffende ziekteverwekker. Een aantal experimentele trials, ook in mensen, hebben intussen laten zien dat het principe van DNA vaccinatie werkt (zie bijvoorbeeld Drape et al, 2006), niet alleen tegen infectieziekten maar ook tegen auto-immuunziekten (Ferrera et al., 2007). Recent is het eerste veterinaire DNA vaccin door USDA goedgekeurd, dit vaccin biedt paarden bescherming tegen het West Nile virus (CDC, 2005). De belangrijkste voordelen van DNA vaccinatie zijn: betere expositie van antigene peptiden aan het immuunsysteem door de langdurige endogene synthese van het antigeen; betere antigeen processing en presentatie; co-expressie van andere antigenen eenvoudig te verwezenlijken; goedkope productie; en DNA vaccins lijken relatief veilig. De meest primitieve vorm van DNA vaccinatie bestaat uit het injecteren van DNA met behulp van een injectiespuit. In de

afgelopen jaren zijn een groot aantal variaties hierop ontwikkeld, onder andere het gebruik van zogenaamde “Gene Guns” (met behulp van micropartikels van goud of van biologische afbreekbare polymeren [PLG]), Biojets, in-vivo electroporatie of tatoeage. Al deze varianten hebben tot doel om de efficiëntie van DNA transfer naar de targetcellen te verhogen. Bij tatoeage wordt niet in de spier, maar in de huid gevaccineerd. Nadat een kleine hoeveelheid DNA vaccin op de huid is gedruppeld, wordt het vaccin met een tatoeageapparaat in een paar seconden in tienduizenden gaatjes in de huid geponst. Dit zorgt voor een lichte huidbeschadiging en voor een betere mobilisatie van afweercellen. Hierdoor komt de immuun reactie sneller en heviger op gang. Naast intramusculaire en intra-dermale methoden van naakt DNA transfer zijn er, voor (gen)therapeutische doeleinden, ook andere toedieningmethoden beschreven waaronder systemisch, intraveneus, intrapleuraal, intrapericardiaal, intraorgaan, of met behulp van katheters. Hoewel de techniek van “DNA vaccinatie” is ontwikkeld voor DNA-transfer van antigeen-coderende genen, kan de techniek natuurlijk ook worden toegepast voor andere genen dan antigeen-coderende genen.

2.2.2.6 RNA-interferentie

RNA-interferentie (RNAi) is een biologisch verschijnsel dat onder andere een rol speelt bij de afweer tegen virussen. Het is een mechanisme waarmee de activiteit van specifieke genen geremd kan worden. De blokkade vindt plaats op het niveau van het mRNA waardoor er geen eiwit meer gevormd wordt. Het was al langer bekend dat met korte synthetische antisenseketens van een mRNA molecuul, de eiwitsynthese vanaf dit mRNA geremd kan worden en dat het mRNA daarna versneld wordt afgebroken. Aan de basis van RNAi liggen sequenties in het genoom die coderen voor kleine RNA moleculen die complementair zijn aan het uit te schakelen mRNA. Deze kleine RNAs worden eerst herkend door een enzym en vervolgens in kleinere fragmenten geknipt, de zogenaamde "short interfering RNAs" (siRNA) van ongeveer 25 basenparen. Deze siRNAs zijn verantwoordelijk voor de uiteindelijke blokkade en versnelde afbraak van het mRNA. RNAi wordt in het moleculair biologisch onderzoek al langer gebruikt om genen uit te schakelen, of beter gezegd om de expressie van gen te remmen (knock-down mutanten). Dit wordt in het fundamenteel onderzoek toegepast om de functie van genen vast te stellen. Het mechanisme werkt niet altijd target specifiek en kan dus pleiotrope effecten hebben. In 2006 kregen de Amerikanen Fire en Mello een Nobelprijs voor hun werk aan RNA interferentie. Een aantal aandoeningen bij mensen zouden met RNAi technologie in combinatie met genterapie doeltreffend(er) behandeld kunnen worden. Ook lopen er bijvoorbeeld onderzoekslijnen om in transgene muizen en kippen resistentie tegen influenza te induceren door gebruik te maken van de RNAi technologie waarbij onder andere de immuunrespons-onderdrukkende activiteit en de vermeerdering van het virus geremd worden door RNAi (Tizard et al, 2007). Vanwege de “genetic drift” van het influenzavirus is het belangrijk doelsequenties te kiezen die geconserveerd blijven in de verschillende virus-mutanten die kunnen ontstaan.

2.2.2.7 Detectie van producten van recombinant DNA technieken

Voor de detectie van DNA dat codeert voor lichaamseigen eiwitten geldt dezelfde problematiek met betrekking tot detectie als hierboven (paragraaf 2.2.1.5).

Als een gen ingespoten wordt bij een dier zal het door de lichaamscellen worden opgenomen en vervolgens vertaald worden in eiwit. Zowel het ingespoten gen als het geproduceerde eiwit zullen lokaal op de injectieplaats aanwezig zijn en daar hun werk doen. Als het effect beperkt blijft tot de injectieplaats (bijvoorbeeld in een spier) is het alleen mogelijk om met behulp van biopten de

aanwezigheid van het gen of het eiwit aan te tonen. Echter als de injectieplaats niet bekend is, is het vrijwel ondoenlijk om het betreffende gen of eventueel geassocieerde chemicaliën zoals adjuvantia of transfectiemiddelen op te sporen. Het is zoeken naar een naald in een hooiberg.

Indien sprake is van de toediening in de vorm van een virale vector (transductie) is het eventueel mogelijk om een antilichaamrespons te meten tegen eiwitten van de virale vector. In dat geval moet het dier bij voorkeur seronegatief zijn voor deze virale vector.

De effecten van bepaalde vormen van genterapie, bijvoorbeeld genetische bloeddoping, zijn niet beperkt tot de injectieplaats en kunnen effecten teweeg brengen in andere delen van het lichaam. Het is haast onmogelijk om dit op het spoor te komen indien er geen onderscheid kan worden gemaakt tussen het lichaamseigen eiwit en het eiwit dat door het toegediende gen wordt geproduceerd. De enige mogelijkheid zou zijn om een onnatuurlijke verhoging aan te tonen ten opzichte van de normale situatie. Het is echter de vraag of deze normale situatie voldoende stabiel is en met voldoende zekerheid kan worden vastgesteld. Bovendien kan dit door externe of interne factoren per individueel dier of ras mogelijk sterk variëren.

In principe zou het mogelijk zijn om niet het eiwit zelf maar de effecten van het eiwit als uitgangspunt te gebruiken. De (over)expressie van een bepaald eiwit zal effecten veroorzaken die afwijken van de normale situatie. Dit kan bijvoorbeeld een verandering zijn in de expressie van verschillende genen of de daaruit resulterende verandering in eiwitexpressie. Met behulp van DNA micro-array analyses is het mogelijk om verschillen in genexpressie profielen van een groot aantal genen te meten. Met behulp van proteomics technieken is het mogelijk om differentiële expressie van eiwitten te bestuderen.

3 Mogelijke impact van gentechnologie op veehouderij, fokkerij, veterinaire praktijk, dierwelzijn en -gezondheid

3.1 Mogelijke impact van klonering door somatische celkerntransfer

Ervan uitgaande dat kloneren toegestaan zou worden, zou een homogener samenstelling van kuddes met gekloneerde dieren een gunstig effect kunnen hebben voor veehouderij, door onder andere de homogene kwaliteit van het eetbare product. Anderzijds zouden ook ziektes en dergelijke zich makkelijker kunnen verspreiden door een homogene populatie. Identificatie van gekloneerde dieren met DNA paspoort en dergelijke vraagt wellicht ook een andere aanpak indien er geen of nauwelijks verschillen in het genetisch materiaal voorkomen. Afhankelijk van het al dan niet hebben van een GGO-status van deze dieren zouden er additionele maatregelen nodig zijn voor inperking, etikettering van de producten en internationale handel. Voor fokkerij is de versnelde introductie van bepaalde wenselijke eigenschappen in een populatie met genetisch identieke klonen een mogelijk voordeel.

Een homogener samenstelling van de veestapel die bestaat uit gekloneerde dieren heeft voor- en nadelen. Aan de ene kant zal een genetisch homogener groep dieren het management vereenvoudigen, aangezien de dieren nagenoeg dezelfde eisen stellen. Bijvoorbeeld in het geval van dieren voor de vleesproductie is het voor de veehouder van economisch belang om zijn dieren op leeftijd van slachten op een homogeen gewicht te hebben. In het huidige systeem zijn de dieren in een dergelijke groep genetisch niet gelijk. Dit veroorzaakt verschillen in eindgewicht, omdat de een meer aanleg heeft voor groeien dan de ander. Bij een groep gekloneerde dieren zal deze genetische variatie een minder belangrijke rol spelen. Dit betekent echter ook een nadeel: als er geen genetische variatie bestaat dan kan er ook niet geselecteerd worden. Het is dus zaak dat de fokkerijorganisaties een grote populatie van niet gekloneerde dieren in stand houden, zodat de genetische variatie gewaarborgd blijft en genetische verbetering mogelijk blijft. De fokkerij organisaties kunnen dan de klonen als eindproduct aanbieden aan de veehouders. Logistiek gezien zal dit in de varkens- en pluimveefokkerij een minder groot probleem zijn dan in de rundveefokkerij, aangezien de dieren die gebruikt worden voor selectie in het geval van de varkens- en pluimvee-industrie in handen zijn van commerciële fokkerij-organisaties. In het geval van de melkvee-industrie zijn de mannelijke dieren vaak in handen van de industrie terwijl de meeste vrouwelijke dieren in eigendom van de individuele veehouders zijn.

Een ander aspect van het houden van grote groepen genetisch identieke dieren, zowel gekloneerd als niet-gekloneerd, is het risico op ziekte insleep. De dieren zijn genetisch identiek en daarmee is hun afweer ook genetisch identiek. In een gewone populatie zal het ene dier beter bestand zijn tegen de ene infectie en een ander dier beter tegen een andere infectie. Hiermee wordt het risico van vernietiging van de populatie door een uitbraak van een besmettelijke en fatale ziekte beperkt. Dit risico bestaat wel degelijk in het geval van een genetisch identieke populatie. Ook het pathogeen zal profiteren van deze identiekheid, aangezien deze nu de kans krijgt om zo te evolueren dat de gastheer nog minder goed bestand is tegen zijn invasie. In een normale populatie is er sprake van gastheer-pathogeen co-evolutie, hetgeen in het geval van gekloneerde dieren tot een kudde-pathogeen relatie verwordt, tenzij de klonering pas in de laatste fase voor het eindproduct wordt uitgevoerd.

Voor de genetische verbetering van een populatie kan het aantrekkelijk zijn om met behulp van somatische celkerntransfer nieuwe eigenschappen in te brengen, of een verloren eigenschap terug te halen. Resultaten tot nog toe lijken erop te wijzen dat het dier geboren uit somatische celkerntransfer weliswaar kans heeft de gewenste eigenschap inderdaad tot expressie te brengen, maar het is zeker niet gegarandeerd dat nakomelingen van het dier dat ook zullen doen. De techniek is nog steeds in het experimentele stadium en gezien de lage succesratio en de hoge kosten is het de vraag of dit ooit op commerciële schaal zal worden toegepast. Bovendien kan er door klassieke genetische selectie, zeker als genomische informatie wordt meegenomen, al zoveel bereikt worden dat het niet waarschijnlijk is dat deze techniek veel toegepast zal gaan worden. Bovendien zijn landbouwhuisdieren niet duur, dus voor “gewone” dieren die worden gehouden voor productie van levensmiddelen van dierlijke oorsprong zouden de kosten mogelijk niet tegen de baten kunnen opwegen.

Een andere situatie ontstaat als de regelgeving aangepast wordt voor de productie van dieren die genetisch gemodificeerd zijn ten bate van productie van een geneesmiddel(component). Het zou kunnen dat dieren deze componenten sneller en goedkoper kunnen produceren dan via de artificiële weg mogelijk is.

Een additionele toepassing van klonering van landbouwhuisdieren zou niet-landbouwkundig kunnen zijn. In de Verenigde Staten is in 2006 een beroemd rodeo race paard gekloneerd door een commerciële firma om zo de unieke genetische eigenschappen te bewaren (Viagen, 2006a). Er waren 4 pogingen nodig om een geslaagd exemplaar te verkrijgen. Ook voor andere waardevolle sportpaarden wordt deze service aangeboden (Viagen, 2006b). Hoewel gekloneerde dieren wettelijk waarschijnlijk niet mee mogen doen bij wedstrijden is er weinig kans dat ze ontdekt worden.

Met betrekking tot dierenwelzijn en –gezondheid zijn er gegevens in de literatuur die op mogelijke complicaties bij klonering door celkerntransfer duiden. Gekloneerde runderen vertonen bijvoorbeeld vaak een verminderde fertiliteit door een verhoogde foetale en embryonale resorptie, terwijl ook cardiopulmonaire en placentale afwijkingen optreden en laesies in het skelet en spiersysteem (Hill et al. 1999). Post mortem onderzoek van lammeren en kalveren die doodgeboren waren of kort na de geboorte waren gestorven na klonering door celkerntransfer of in vitro embryocultuur vertoonden een breed scala aan afwijkingen (Van Reenen and Blokhuis, 1997). Dit betrof onvolledige ontwikkeling van het vaatstelsel of het urogenitale stelsel (Campbell et al., 1996), thymus atrofie en lymfopenie voorafgegaan door ernstige anemie (Renard et al., 1999) en hersenbeschadigingen (Schmidt et al., 1996).

Omdat deze afwijkingen, die in experimentele dieren zijn waargenomen, voor de economische waarde van de dieren ook nadelig zullen zijn, is het waarschijnlijk dat in de praktijk de gezonde exemplaren voor verdere commercialisering geselecteerd zullen worden. Ook zal in de veiligheidsbeoordeling een vergelijking gemaakt worden tussen het gekloneerde dier en een conventionele tegenhanger, waarbij deze verschillen ook aan bod komen (zie desbetreffend hoofdstuk hieronder). Behalve de focus op veiligheid van de consument zal hierin ook de veiligheid voor de gezondheid en het welzijn van het dier beschouwd dienen te worden, ondermeer binnen het raamwerk van de ethische toetsing.

3.2 Mogelijke impact van transgene dieren

Transgene dieren die geproduceerd zijn met behulp van recombinant DNA technologie kunnen wezenlijk anders zijn dan dieren uit de “oorspronkelijke populatie.” In de Verenigde Staten is bijvoorbeeld een sneller groeiende zalm ontwikkeld met een additioneel ingebracht gen dat codeert voor de aanmaak van groeihormoon. Deze zalm zal in de Verenigde Staten waarschijnlijk binnenkort commercieel op de markt komen. Voor kweekvissen zijn verschillende mogelijke maatregelen beschreven om ongewenste verspreiding van transgene kenmerken te voorkomen, zoals het steriliseren van vissen door triploïdie en het houden van vissen in faciliteiten zonder toegang tot open water. Voor dieren die met groeihormoon gemodificeerd zijn, zoals vissen, is het selecteren op grootte in verband met de invloed van grootte op het onderlinge gedrag gewenst (Hallerman et al., 2007). Ook zouden bij kortere generatietijden en eerdere hormonale veranderingen jonge kweekzalm bijvoorbeeld eerder van zoet naar zout water dienen te worden overgezet. Bij het gebruik van induceerbare/rembare transgenen zijn aparte toevoegingen van de remmer/inducerende substantie aan het voer nodig. Bij internationale handel dienen deze dieren aangemeld te worden als levende gemodificeerde organismen bij het Biosafety Clearinghouse onder het Cartagena protocol voor biodiversiteit.

Bij landbouwhuisdieren is deze vraag nog niet actueel. In Nederland is er een verbod op het produceren van transgene dieren voor voedselproductie. Transgene proefdieren, zoals “knock-out” muizen waar een bepaald gen buiten werking is gesteld, zijn wel toegestaan. Het houden van deze dieren is aan strenge eisen verbonden, om ontsnapping en vervolgens menging met de wilde soortgenoten te voorkomen. Een dergelijk gevaar zal bij landbouwhuisdieren veel minder groot zijn. Wilde soortgenoten zijn er niet voor het rund en de kip, en er zijn in Nederland geen gevallen bekend van varkens die na uitbraak met hun wilde soortgenoten hebben gepaard. Wel bestaat de mogelijkheid dat dieren, na menging met niet transgene soortgenoten uit bijvoorbeeld een naburig hok of weiland, hun transgenese ongepland doorgeven. Indien dit niet wordt opgemerkt, kunnen op die manier dierlijke producten voor consumptie op de markt komen die door (nakomelingen van) transgene dieren zijn geproduceerd. Voor de geloofwaardigheid en de productgarantie is het van essentieel belang dat de transgene dieren geen kans krijgen te paren met niet-transgene dieren. Hiertoe zou de huisvesting in sommige gevallen (buiten gehouden dieren als melkvee) aangepast dienen te worden, regelgeving moeten komen op het vervoer en de verwerking van de producten, en etikettering in de winkels.

Door het gebruik van recombinant DNA technieken kunnen bepaalde kruisingschema's van wenselijke eigenschappen in de fokkerij vermeden worden. Wel dienen de gemodificeerde dieren eerst op de meest optimale expressie en fenotypische kenmerken geselecteerd te worden. Ook dient het werken in de labfaciliteiten en dergelijke die transgeen materiaal gebruiken in de eerste stadia aan extra veiligheidseisen te voldoen.

In het algemeen lijkt het alleen interessant voor de fokkerij als zeker is dat de recombinatie door wordt gegeven aan de nakomelingen en daar ook werkt. De expressie is namelijk met name interessant in de commerciële productiedieren, en niet per se in de dieren die voor de fokkerij worden gebruikt. Het gebruik van recombinant DNA technieken zal alleen interessant zijn wanneer de kosten per dier dusdanig laag zijn dat de opbrengst opweegt tegen de investering. Daar is op dit moment nog geen sprake van. Wel is het zo dat dieren ook zonder recombinant DNA door spontane mutaties al eigenschappen kunnen hebben die uniek zijn en gewenst in de rest van de populatie. Voorbeelden hiervan zijn de dubbele bespiering bij schapen, koeien, mensen, honden, die wordt bepaald door een

mutatie in het callipyge-gen, zoals voor schapen beschreven door Freking en collega's (2002). Een mutatie in het groeihormoon kan ook interessant zijn om te identificeren, zoals bijvoorbeeld een mutatie in IGF2 met een sterke invloed op de spiergroei bij varkens (Van Laere et al., 2003).

Mochten gemodificeerde dieren in de fokkerij worden gebruikt, dan is het van belang om ook aandacht te besteden aan de kwaliteiten van die dieren voor andere kenmerken waarop ook geselecteerd worden. Anders wordt er wel vooruitgang geboekt op het kenmerk waarvoor dieren gemodificeerd zijn, maar niet, of mogelijk zelfs achteruitgang, op andere kenmerken, hetgeen niet alleen voor genetische gemodificeerde dieren geldt. Bijvoorbeeld, selectie op dieren die gemodificeerd zijn op IGF2 zullen in een fokprogramma ook goed moeten scoren op kenmerken als gezondheid en reproductiecapaciteit. Dit houdt in dat er voldoende aantallen gemodificeerde dieren geproduceerd moeten worden om aan deze eisen te kunnen voldoen.

Bij de productie van gemodificeerde dieren zullen de nodige voorzorgsmaatregelen worden genomen in de laboratoria zodat verontreiniging van ander DNA materiaal met gemodificeerd DNA materiaal niet tot de mogelijkheden behoort. Daar zijn al richtlijnen voor opgesteld ten behoeve van de productie van gemodificeerde laboratoriumdieren. Deze richtlijnen kunnen mogelijk direct gekopieerd worden voor gebruik bij landbouwhuisdieren.

In het algemeen kan geconcludeerd worden dat de gevolgen voor dierenwelzijn en gezondheid afhangen van welke genen beïnvloed worden (transgeen zijn gemaakt). Daarnaast zullen transgene dieren mogelijk anders gehuisvest worden, wat ook invloed kan hebben op hun welzijn. Daar zal rekening mee gehouden moeten worden bij het ontwerp van zulke huisvesting.

Een aantal voorbeelden van mogelijke effecten op dierenwelzijn en gezondheid zijn uit de literatuur bekend. Transgene dieren worden sinds 20 jaar geproduceerd en naast successen blijken er nog zaken mis te gaan (Niemann et al., 2005). In een overzicht van transgene productiedieren en hun toepassingen (Harper et al., 2003) blijken er vele mogelijkheden te zijn, maar veel onderzoek is niet publiek beschikbaar zodat er met name op de experimentele mislukkingen op dit gebied weinig zicht is.

Van Reenen en collega's (2001) beschrijven in hun overzichtsartikel problemen bij de partus, verhoogde abortus incidentie, meer aangeboren afwijkingen, verlengde dracht, verhoogde perinatale sterfte, verhoogd geboortegewicht en andere afwijkingen bij transgene dieren (onder andere Van Reenen and Blokhuis, 1997, Schnieke et al., 1997; Hill et al., 1999; McCreath et al., 2000). Ook veranderde groei van organen en weefsels (onder andere hart en lever) bij transgene lammeren is aangetoond (Sinclair et al., 1999). Transgene kalveren bleken zwakker en hadden vaker medische hulp nodig na de geboorte (Garry et al., 1996).

Om infectie met spongieuze encephalitis te voorkomen zijn schapen transgeen voor het prionlocus gemaakt, echter de gekloneerde lammeren stierven kort na de geboorte (Denning et al., 2001).

Introductie van schapen metallothioneine groeihormoon gen in varkens leidde tot enkele dieren die hoge gehalten aan oGH (ovine-GH) tot expressie brachten, wat bij sommige dieren door Zn suppletie nog eens 20 x verhoogd kon worden. De dieren vertoonden verder een vergrote lever, nier, bijnier en schildklier, en het karkas was minder vet en bevatte meer eiwit en water dan niet transgene nestgenoten

(Pursel et al., 1997). Naast groeihormoon kan ook expressie van insuline like growth factor I (IGF-I) in transgene varkens de spieraanzet beïnvloeden (Pursel et al. 2004). Hoewel de transgene dieren iets minder vet en iets meer spierweefsel hadden dan de controles verschilde de groei en voederconversie nauwelijks. Bij transgene muizen en varkens met extra groeihormoon worden soms afwijkingen in de organen waargenomen, zoals in de nieren of lever of in het bindweefsel (Wanke et al., 1991, Pinkert et al., 1994). Ook verminderde vruchtbaarheid, kortere levensduur, hartafwijkingen en levertumoren zijn waargenomen in transgene muizen gemodificeerd met groeihormoon (Brem et al. 1989; Wolf et al., 1993). Transgene varkens met een rundergroeihormoon construct (phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone construct, PEPCK-bGH) vertoonden niet de nierafwijkingen die bij muizen zijn waargenomen, maar wel sterk vergrote glomeruli in de nier (Pinkert et al., 1994).

Transgene Coho zalmen die een over-expressie van groeihormoon hebben, zijn op 15 maanden 11 x groter dan de controles (Devlin et al., 1994). Echter versnelde groei geeft grotere kwetsbaarheid, grotere sterfte en gebrekkige aanpassing bij minder gunstige omstandigheden (Devlin et al., 2004, Sundt-Hansen et al., 2007). Hoewel gesteld wordt dat transgene zalmen minder kans hebben te overleven in het wild bleken de transgene dieren bij beperkte predatorstudies niet te verschillen in overlevingskansen van controles (Vandersteen Tymchuk et al., 2005).

Melkproductie is ook een veld waar veel geëxperimenteerd is om via transgenese bepaalde eiwitten, koolhydraten of vetten meer of minder in de melk te krijgen. Zo zijn er muizen gecreëerd met verminderd lactose gehalte in de melk. Muizen die homozygoot knock-out waren voor α -lactalbumine bleken dermate viskeuze melk te produceren dat ze hun jongen niet konden voeden (Stinnakre et al., 1994).

Zoals hierboven opgemerkt voor met behulp van somatische celkerntransfer gekloneerde dieren, dienen de risico's voor de diergezondheid van de door genetische modificatie ingebrachte eigenschappen voor transgene dieren beoordeeld te worden in het kader van de "vergelijkende veiligheidsbeoordeling" van GGO's (zie hieronder). In dit opzicht dienen de transgene dieren zelf ook als een "sentinel" voor de mogelijke effecten van de modificatie op dier en mens, voor laatstgenoemde als consument van de eetbare delen van het gemodificeerde dier. Daarnaast spelen bij effecten op diergezondheid en –welzijn ook de ethische aspecten een belangrijke rol, die niet alleen belangrijk zijn voor de wettelijke toelatingsprocedure voor GGO's en andere biotechnologieën, maar ook voor acceptatie in de markt.

3.3 Mogelijke impact van gentherapie en DNA vaccins

Verschillende mogelijke complicaties zijn gemeld met gentherapie, met name in proefdieren en bij humane subjecten (zie hieronder). Naast effecten van de beoogde nieuwe eigenschappen die door de genetische modificatie zijn ingebracht, zijn er ook andere oorzaken denkbaar die tot complicaties kunnen leiden. De condities van DNA integratie zijn bijvoorbeeld minder controleerbaar indien bijvoorbeeld de DNA overdracht niet buiten het lichaam plaatsvindt (zoals in geïsoleerde cellen die vervolgens weer worden ingebracht), hetgeen tot secundaire effecten kan leiden. De eigenschappen van de vectoren gebruikt voor gentherapie en DNA vaccins zelf kunnen ook een punt van aandacht zijn, bijvoorbeeld de activiteit van de ingebrachte virussen. Anderzijds kan het gebruik van zuiver DNA

voor DNA vaccins als alternatief voor bijvoorbeeld vaccins bestaande uit verzwakte pathogenen het gebruik van pathogeen materiaal helpen vermijden.

Bij makaken zijn complicaties gemeld bij het gebruik van rode bloedcel verhogende gentherapie (een soort EPO), waarbij de concentratie rode bloedlichaampjes zo hoog werd dat het bloed te dik werd en dagelijks vloeistof toegediend moest worden. Tevens is bij een aantal diereinden uiteindelijk een immuunreactie gestart tegen de bloedcellen gemaakt via gentherapie, en zo ook tegen de eigen rode bloedcellen. Deze makaken ontwikkelden zware vormen van anaemie (Chenuaud et al., 2004; Gao et al., 2004). Dit voorbeeld geeft aan dat het gebruik van gentherapie door lokaal inspuiten van DNA, afhankelijk van de intentie, nu nog niet zonder risico's is. Het is zeer waarschijnlijk dat dergelijke ongewenste effecten ook bij landbouwhuisdieren op kunnen treden. Afhankelijk van hoe makkelijk het is om aan DNA vaccins te komen, en afhankelijk van op wat voor termijn neveneffecten op kunnen treden, zou het criminele circuit toch gebruik kunnen gaan maken van met name spiervergroterende middelen. Gevolgen voor de diergezondheid zullen afhangen van bovengenoemde timing van de risico's. Wanneer deze risico's te groot zijn zal het voor de toepasser minder interessant zijn omdat de meeropbrengst dan wegvalt tegen de verliezen die optreden door de neveneffecten (misschien zelfs uitval).

Voor de veehouderij en fokkerij kan deze techniek ook consequenties hebben. Indien gentherapie en DNA vaccins op de boerderij dienen te worden toegepast zal dit het gebruik van aangepaste apparatuur en beschermende maatregelen met zich meebrengen.

Wanneer de kosten voor DNA therapie die bijvoorbeeld een spiervergroterende werking hebben laag zijn, en wanneer de gevolgen voor het dierenwelzijn goed beschreven zijn, dan kan het zijn dat het voor veehouders interessant wordt om bijvoorbeeld voor de slachtdatum een dergelijke therapie vaccin op hun dieren toe te passen. Of alleen aan die dieren die iets achterblijven om zo de uniformiteit te verhogen. Gezien de kosten, en gezien de successen die reguliere fokkerij bereikt, lijkt het vergezocht dat dergelijke technieken standaard worden. Zeker omdat vleesproducerende fokdieren over het algemeen in handen zijn van een commerciële organisatie en er dus geen reden is om individuele dieren "op te pompen" om er beter uit te zien voor de verkoop. Dit zou bij schapenvleesrassen wel een rol kunnen spelen omdat daar een handel bestaat in rammen welke met name gebaseerd is op het uiterlijk. Een extra ontwikkelde bespiering kan daar extra winst betekenen. Voor de fokkerij zal DNA therapie geen rol spelen omdat de dieren meestal op basis van fokwaardeschatting worden geselecteerd. Het helpt dan niet een enkel dier te behandelen.

Andere categorieën dieren waarvoor toepassing van gentherapie interessant is zijn de draf- en renpaarden en "greyhounds" (windhonden). Niet zozeer in Nederland, waar de sport relatief erg klein is en er weinig wordt gewed, maar zeker in een groot aantal andere landen zoals de Angelsaksische landen en Japan. Met name in de rensport, maar ook in de draf-sport en bij de racehonden, gaan grote sommen geld om. In de rensport, bijvoorbeeld, is 20.000 Euro's voor een dekking door een bekende hengst zeker geen uitzondering. Mogelijk zou de toepassing van de nieuwe technologie ook voor de dressuur-, spring- en andere takken van paardensport aantrekkelijk kunnen zijn, maar daar gaat aanzienlijk minder geld in om. Voor al deze categorieën van ren- en paarden-sport kunnen ook de ontwikkelingen bij de atletiek en aanverwante sporten op het gebied van gendoping interessant zijn. Ook al omdat gendoping

op het individu zelf inwerkt, en dat is in dit geval precies wat de bedoeling is: winst (van competities) betekent immers geld. Het is van veel minder belang hierbij wat de nakomelingen zullen doen.

Factoren die mogelijk interessant om de prestaties te verbeteren zijn bijvoorbeeld genen die de bespiering, de bloedproductie of de zuurstofcapaciteit van het bloed regelen, en genen die de pijnperceptie modificeren (Filipp, 2007).

4 Genetische technieken bij dieren versus gendoping bij mensen

Analoog aan sport-doping, namelijk het gebruik van prestatieverhogende middelen die tot onfaire praktijken in de sport leiden, is de werk-definitie van gen-doping voor dit rapport de niet-geautoriseerde toepassing van genetische modificatie voor de verbetering van prestaties in sporters. Overigens zijn er op het gebied van bijvoorbeeld anabolica, overeenkomsten tussen de stoffen die in het verleden voor sportdoping zijn gebruikt en als illegale hormonen in de vleesproducerende landbouwhuisdieren. Voor gen-doping zullen waarschijnlijk evenzeer parallellen getrokken kunnen worden tussen sport en dierlijke productie.

In Amerika gebruikt bijvoorbeeld 95% van de veetelers hormonen (meestal anabole steroïden en/of beta-agonisten, maar ook groeihormoon) op overigens legale wijze. Hormoonvrije vleesproductie komt daar nauwelijks voor (Koert, 2003). Hoewel voornamelijk toegepast in runderen ten behoeve van een verhoogde melkproductie, is groeihormoon (GH) ook zeer effectief gebleken in het bevorderen van groei en vleesopbrengst in varkens, schapen en runderen. Recombinant geproduceerd groeihormoon of somatotropine (rpST) is goedgekeurd voor gebruik in varkens in verschillende landen, maar niet in de Verenigde Staten. Toepassing van de bovine of ovine analogen rbST en roST is niet toegestaan voor de productie van vleesrunderen of voor lamsvlees productie (Dikeman, 2007).

Behalve door rechtstreekse toediening van het hormoon kan het beoogde effect ook worden verkregen door injectie van het corresponderende gen. Voor zover bekend wordt injectie van DNA tot nu toe alleen toegepast binnen de medische wetenschap voor therapeutische doeleinden. Zo wordt bijvoorbeeld het VEGF gen toegediend voor het bevorderen van bloedvatvernieuwing in patiënten met coronaire aandoeningen, waarbij gebruik wordt gemaakt van virale vectoren (Van Weel et al., 2004). De vrees bestaat dat toediening van genen ook zal worden toegepast voor niet-medische doeleinden, zoals prestatiebevordering in de sport (gendoping), of opbrengstverbetering in de veehouderij.

4.1 Kwantiteit

Groeihormoon is een natuurlijk anabool hormoon, dat tijdens het gehele leven geproduceerd wordt door de hypofyse. Het bevordert de groei van spieren en botten, en het verbranden van vet. Een soortgelijke werking heeft het hormoon IGF-1; het wordt geproduceerd in de lever en in spieren, onder invloed van GH en veroorzaakt naast prestatieverhoging ook een toename van de spiermassa (Lee et al., 2004). De genen voor GH of IGF-1, of het gen voor het GH-regulerende peptide GHRH, kunnen worden ingebouwd in verzwakte virussen, en vervolgens na injectie in dieren zorgen voor een meer efficiënte en vergrote aanzet van vlees.

Voor de vleesproductie zouden ook met myostatine gemodificeerde, transgene dieren interessant zijn. Myostatine is een negatieve groeifactor voor spiergroei in muizen, runderen en mensen. Mutaties voor myostatine leiden tot de dubbelgespierde dieren. Hetzelfde effect als deze mutaties zou in theorie ook middels gendoping bewerkstelligd kunnen worden ten behoeve van opbrengstverbetering, bijvoorbeeld

met behulp van inactivatie van het gen voor myostatine, onder andere door gen mutatie of door het vergroten van het aantal kopieën van het follistatine gen waardoor myostatine wordt geïnactiveerd (Lee, 2007). De mutatie is tot dusver voornamelijk aangetoond als een natuurlijke variant in runderen (het dikbilrond Belgische Blauwe). De verwachting is echter dat het myostatine gen gebruikt kan worden voor verhoogde vleesopbrengst in andere runderrassen, en zelfs in schapen, varkens, geiten, etcetera (Bellinge et al., 2004), naar analogie van de supergespierde muis (“Schwarzenegger muis,” referentie Lee, 2007). Transgene dubbelgespierde muizen zijn al ontwikkeld, deze vertoonden bij een hoog vetdieet nog meer spiergroei en zetten minder vet aan dan controles (Yang and Zhao, 2006).

4.2 Kwaliteit

Behalve voor vergroting van de opbrengst kan gendoping ook gebruikt worden voor verbetering van de kwaliteit van vlees. Bij vleeskwaliteit speelt het type spiervezels een belangrijke rol, wat tot uitdrukking komt in de definities van wit- en roodvlees productie. In het algemene spraakgebruik wordt er daarbij van uitgegaan dat witvlees staat voor pluimvee vlees, en roodvlees voor alle overige soorten vlees (ook al is de kleur eerder rose, zoals bij varkensvlees). Verbetering van vleeskwaliteit betekent daarom bij pluimvee dat het vlees “witter” wordt, en bij andere diersoorten dat het “(helderder) rood” wordt.

Roodvlees bestaat voornamelijk uit zogeheten langzame (slow-twitch) spiervezels, die gespecialiseerd zijn in langdurige inspanning (staan, lopen, langzaam zwemmen; vezels raken niet snel vermoeid), en die hun energie krijgen uit hun hoge myoglobine gehalte. Deze vezels worden ook wel aangeduid als “type I”, en vormen de zogeheten “oxydatieve vezels”; het ATP metabolisme verloopt voornamelijk via consumptie van zuurstof, welke behalve door extra myoglobine ook wordt bevorderd door een hoge mate van doorbloeding (hoge capillarisatiegraad).

Snelle spiervezels vormen daarentegen het hoofdbestanddeel van wit vlees: zij zijn gespecialiseerd in het leveren van kortdurende piek inspanningen (sprinten, korte vluchten; vezels raken snel vermoeid) en bevatten minder myoglobine. Omdat kippen en kalkoenen vooral staan of rondscharrelen en zelden vliegen, is hun pootvlees rood terwijl hun borst- en vleugelvlees vooral wit is. Omgekeerd hebben wilde vogels die veel vliegen, zoals eenden, rood borst- en vleugelvlees (Brent en Tabin, 2004). Snelle vezels worden meestal aangeduid als “type II”, waarbij er nog een onderscheid wordt gemaakt naar IIa (oxydatief maar wel snelle contractie), IIb (glycolytische vezels die snel contraheren, en die hun energie vooral halen uit anaerobe omzetting van glycogeen =glycolyse), en type II X (intermediair tussen IIa en IIb) (Arany et al., 2007).

In de literatuur zijn verschillende publicaties te vinden van genen die in staat zijn om glycolytische vezels (type IIb) om te zetten in oxydatieve vezels (type I en IIa). Bij landbouwhuisdieren is dit weliswaar nog niet onderzocht, maar te verwachten valt dat eventuele toepassing zal resulteren in verbeterde kwaliteit van de roodvleesproductie. Enkele genen die hierbij een rol spelen zijn “transcriptional” co-activators PGC-1 α (Lin et al. 2002) en PGC-1 β (Arany et al., 2007), PPAR δ (Wang et al., 2004), ACTN3 (MacArthur et al., 2007), PEPCCK-C (Hakimi et al., 2007). Bij vissen is in dit verband het Blimp gen geïdentificeerd (Brent en Tabin, 2004). Daarnaast kunnen ook genen die in het

algemeen de bloedvoorziening bevorderen, de roodvleeskwaliteit waarschijnlijk verbeteren, zoals VEGF en EPO.

Bovengenoemde genen zijn vooral bekend als prestatie bevorderende genen, die het uithoudingsvermogen vergroten ("marathonmuis," als model voor de mens). Het is echter denkbaar dat ook bij dieren de prestatiebevorderende werking een rol gaat spelen, vooral in de paardensport en bij hondenrennen.

4.3 Mogelijke toepassing bij dieren van strategieën voor detectie van gendoping bij mensen

Er zijn een aantal conceptuele en praktische bezwaren, waardoor er momenteel geen testen bestaan die gendoping kunnen aantonen (Azzazy et al., 2005). Naast het feit dat het eiwit zoals geproduceerd door het vreemde gen of door de genetisch gemanipuleerde cellen identiek is aan het endogene eiwit, worden de meeste gendoping eiwitten -met name de spierbevorderende- lokaal in de spier aangemaakt en zijn ze niet aanwezig in bloed of urine, zoals in het geval van IGF-1. De enige betrouwbare bepaling zou gebaseerd dienen te zijn op een spierbiopsie; dit is bij sportmensen nagenoeg niet toepasbaar, maar zou in principe wel mogelijk zijn bij (landbouwhuis)dieren, eventueel onder toepassing van lokale anaesthesie.

Een ander probleem met spier-gebaseerde therapieën is echter, dat deze hun werking alleen uitoefenen in de directe omgeving van de injectieplaats. Een voorbeeld is injectie van een vector (DNA, virus, cellen) voor de lokale aanmaak van groeihormoon dat vervolgens, door systemische verspreiding van het groeihormoon via de bloedsomloop, een systemisch effect in het hele dier teweegbrengt. Dit houdt in dat het biopsie monster moet worden genomen op de specifieke plaats van injectie hetgeen gelijk staat aan het zoeken naar een (de) naald in een hooiberg.

4.3.1 *Structurele verschillen tussen eiwitten geproduceerd door transgenen*

Andere vormen van gendoping, bijvoorbeeld gen-gebaseerde bloeddoping, zijn niet op deze manier beperkt tot een bepaald weefsel in het lichaam. De injectie van een gen dat verantwoordelijk is voor de productie van het bloedstimulerende EPO kan op nagenoeg elke plek in het lichaam plaatsvinden, waarna het genconstruct zich via de bloedstroom kan verplaatsen naar het lokale EPO-producerende weefsel (Staun, 2006).

Er zijn echter ook aanwijzingen dat injectie van EPO cDNA in de spier van apen een klein structureel verschil laat zien in het geproduceerde EPO. Dit kan ertoe leiden, dat op deze manier geproduceerd EPO in de gastheer een afwijkende immunrespons opwekt die detecteerbaar is. Ook is dit een reden om te veronderstellen dat verschillende weefsels na toediening van doping verschillende vormen van EPO produceren (Lasne et al., 2004).

4.3.2 *Immuunrespons tegen virale vectoren*

Directe detectie van virale vectoren is moeilijk, omdat ze slechts kort na toediening meetbaar zijn en omdat het nemen van een weefselmonster hiervoor soms noodzakelijk is. Mogelijk kan echter de immuun respons van de gastheer op de aanwezigheid van virale vectoren worden gebruikt als een indirecte aanwijzing voor het toedienen van gendoping. Een nadeel is echter dat de gastheer ook langs natuurlijke weg geïnfecteerd kan zijn geraakt met het virus, waardoor de detectie van specifieke antilichamen geen bewijs hoeft te zijn van dopinggebruik.

4.3.3 *Gen-expressie profilering (transcriptie profilering)*

Er is een techniek beschikbaar die bekend staat als de “microarray DNA analyse”, en die een genetische voetafdruk kan maken van de menselijke of dierlijke gen-activiteit. Met deze techniek is het mogelijk om gendoping in sporters te monitoren, door te kijken naar de expressieprofielen van endogene genen die veranderd kunnen zijn na de expressie van een vreemd gen. De bruikbaarheid van deze methode is in principe bewezen weliswaar niet voor gendoping, maar voor het aantonen van het anabole steroidhormoon tetrahydrogestrinon (THG) (Labrie et al., 2005). Deze techniek vereist wel het nauwkeurig bekend zijn van het “normale” profiel, waarbij rekening dient te worden gehouden met individuele verschillen en met normale variaties binnen een individu. De kosten van deze techniek dalen de laatste tijd.

In 2005 en 2006 heeft het Wereld Anti-Doping Agentschap (“World Anti-Doping Agency,” WADA) een aantal onderzoeksprojecten in gang gezet, om de mogelijkheden van deze techniek te onderzoeken (Rupert en McKenzie, 2005; Ho et al., 2005; Gmeiner et al., 2005; Schonfelder et al., 2006). Een variant op deze techniek is de PET- of SPECT-scan methode. Hierbij wordt een radioactief gelabelde peptide-nucleïnezuur dat hybriseert met een specifieke mRNA sequentie, zoals van EPO, toegediend aan mens of dier, waarna met een scanner een afbeelding wordt gemaakt van de eventuele doping plaats (Segura et al, 2006).

4.3.4 *Eiwit profilering (proteomics)*

Volgens een in 2004 verschenen rapport van het Nederlands Centrum voor Dopingvraagstukken (NECEDO) is toepassing van genetische doping alleen vast te stellen door herhaaldelijk een eiwitprofiel te bepalen, zodat veranderingen in eiwitniveau's binnen een individu kunnen worden vastgesteld. Deze testen vereisen gelijktijdige bepaling van vele (mogelijk tot duizend) verschillende eiwitten, en er dient te worden vastgesteld wat de normale concentraties van deze eiwitten zijn (Haisma et al 2004; Haisma en De Hon 2006a,b). In een modelstudie met toegevoegd humaan groeihormoon is aangetoond, dat deze methode in principe toepasbaar is middels bepaling van het eiwitprofiel in bloedplasma (Wu et al. 2002). Ook voor het testen van diergezondheid zijn met deze techniek al veelbelovende experimentele resultaten behaald. Voorbeelden van de proteomics techniek toegepast in landbouwhuisdieren zijn de opheldering van eiwitten betrokken bij hartafwijkingen en verlaagde immuun-respons bij stress in runderen, en oogafwijkingen (uveïtis) in paarden (Doherty et al., 2008; Lippolis en Reinhardt, 2008). De eiwitten die een sleutelrol bij ziektes en gezondheid spelen zouden als “biomarker” voor een algemene gezondheidsbepaling gebruikt kunnen worden.

Het definitief identificeren van de eiwitten met afwijkende concentratie is mogelijk door de tweedimensionale gel-electroforese (2D-GE) techniek gecombineerd met MALDI-TOF MS/MS massaspectrometrie, of door één-dimensionale vloeistofchromatografie gekoppeld met “ion-trap” massaspectrometrie (1D LC/MS). WADA heeft op dit gebied een aantal onderzoeksprojecten gestart (Roberts et al., 2004; Thevis et al., 2006; Jorgensen en Kopchick, 2006).

Snelle en high-throughput analyse van grote aantallen monsters is mogelijk met de SELDI-TOF massaspectrometer, waarbij weliswaar geen identificatie van individuele eiwitten plaatsvindt, maar waarbij kenmerkende profielen worden vastgesteld die typerend kunnen zijn voor afwijkingen. Deze techniek is beschikbaar binnen ASG-WUR, in Lelystad (Van de Wiel, D.F.M., persoonlijke mededeling).

4.3.5 *DNA barcodes*

Door toevoeging van een klein stukje uniek DNA aan elk transgeen gen en virale vector kan in principe onderscheid worden gemaakt tussen een transgeen gen en het endogene gen. Middels een simpele PCR test is het dan mogelijk om een transgene gen te ontdekken. Deze benadering vereist echter de medewerking van een groot aantal farmaceutische firma's, nationale en internationale organisaties, diagnostische laboratoria, etcetera, wat waarschijnlijk het grootste obstakel zal blijken te zijn voor effectieve toepassing.

4.3.6 *Polymerase kettingreactie (PCR)*

Voor het geval dat genterapie plaatsvindt via intramusculaire injectie van naakt plasmide-DNA, zou het in principe mogelijk zijn om door middel van een PCR test het circulerende plasmide aan te tonen. Hierbij moet dan de DNA sequentie van (een deel van) het plasmide non-variabel worden verondersteld, en is de test gebaseerd op het aantonen van dit non-variabele gedeelte (Snyder en Moullier 2006; WADA, 2007), of op het ontbreken van introns in het transgene DNA (Simon et al. 2006; WADA, 2007). Dit geldt ook voor virale factoren. Een potentieel probleem is dat plasmiden en vectoren meestal niet kunnen repliceren waardoor de doelsequentie niet meer of alleen in lage hoeveelheden voorkomt.

4.3.7 *Cel biosensors*

Serum van mens (of dier) dat verdacht wordt van doping, kan geplaatst worden op een kweek van spiercellen die fungeren als een “cel-biosensor.” Als het monster niet-fysiologische concentraties bevat van exogeen GH, dan resulteert dit in de expressie van MGF (humaan IGF-IEc) RNA, dat betrokken is bij het proces van spierhypertrofie. Dit is een normaal fysiologisch proces, maar kwantitatief verschillend in geval van doping (Goldspink et al. 2003; WADA, 2007)

4.3.8 *Multiplex immuno PCR fingerprint*

Toediening van genetisch materiaal van vooral een myostatineremmer, resulteert in veranderingen in de signaal transductie route, waarbij de ratio's van de daarmee verband houdende factoren veranderen. Een methode wordt ontwikkeld waarbij simultaan de expressie van verschillende van deze factoren en

signaaltransductie moleculen wordt geanalyseerd door middel van immuno PCR (iPCR; Diel et al., 2005; WADA, 2007).

5 Nationaal veiligheidsbeleid en regelgeving

5.1 Huidig beleid en regelgeving

5.1.1 *Regelgeving van klonering door somatische celkerntransfer*

Nederland hanteert een restrictief beleid ten aanzien van biotechnologie bij dieren. In het kader van het Besluit biotechnologie bij dieren, onderdeel van de Gezondheids- en Welzijnswet voor Dieren, moet voor het verrichten van biotechnologische handelingen bij dieren een vergunning aangevraagd worden bij het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV). Op grond van deze wet is het in Nederland verboden om zonder vergunning biotechnologische handelingen bij dieren uit te voeren. Onder biotechnologische handelingen wordt hierbij verstaan: transgenese bij dieren en embryotechnologie. Dit betekent dat het genetisch modificeren of het kloneren van dieren met behulp van kerntransplantatie zonder vergunning niet is toegestaan.

Bij biotechnologische handelingen bij dieren moet gedacht worden aan:

- Het wijzigen van het genetisch materiaal van levende dieren door middel van:
 - het toepassen van recombinant DNA technieken waarbij gebruik wordt gemaakt van het inbrengen van genetisch materiaal met behulp van een virus of ander vector in een geslachtscel, een bevruchte eicel of een embryo.
 - het rechtstreeks in een dier, in een bevruchte eicel of in een dierlijk embryo brengen van genetisch materiaal dat buiten het dier is geprepareerd, al dan niet met gebruikmaking van micro-injectie of micro-encapsulatie.
 - het toepassen van celfusie- of hybridisatietechnieken, waarbij levende dierlijke cellen met nieuwe combinaties van genetisch materiaal worden gevormd door de fusie van twee of meer cellen met gebruikmaking van methoden die van nature niet voorkomen, voor zover dit kan leiden tot een dier met gewijzigde genetische eigenschappen.
- Het kloneren van dieren met behulp van kerntransplantatie.
- Het tot stand brengen van chimaeren, ongeacht de wijze waarop dit gebeurt. Hierbij gaat het om kiembaanchimaeren. Bloedtransfusie en orgaantransplantatie vallen hier niet onder.

Na advisering door de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD) kan de minister onder bepaalde voorwaarden een vergunning verlenen. In de CBD zitten deskundigen op het terrein van de maatschappijwetenschappen, biotechnologie, dierproefvraagstukken, diergeneeskunde, medische wetenschappen, diergedrag en ethiek. Een vergunning wordt in het algemeen verleend als de handelingen geen onaanvaardbare gevolgen hebben voor de gezondheid en het welzijn van dieren, en er tegen de handelingen geen ethische bezwaren bestaan. De CBD onderwerpt elke individuele vergunningaanvraag aan een ethische, gezondheids- en welzijnstoets die tot doel heeft om te bepalen of aan de hierboven genoemde voorwaarden voldaan wordt. Een belangrijk onderdeel van de gehele vergunningsprocedure is de hoorzitting in het kader van de Wet Openbaarheid van Bestuur en de mogelijkheid die groeperingen hebben om in beroep te kunnen gaan tegen een besluit van de Minister.

Zoals hierboven in de inleiding (sectie 2.1) is opgemerkt is er nog een discussie gaande over welke regelgeving van toepassing is op voedingsproducten van door celkern transfer gekloneerde dieren. Dit

zal consequenties hebben voor de toelatingsvereisten en bijvoorbeeld ook voor de etikettering van deze producten. Hoewel het kloneren van dieren door middel van somatische kerntransplantatie (zoals schaap Dolly) strict genomen onder de definitie van genetische modificatie valt, worden experimentele gekloneerde dieren vooralsnog in Nederland niet als genetische gemodificeerde dieren behandeld. Echter, aangezien er tot nu toe, althans in Europa, nog geen sprake is van het op de markt brengen van producten van gekloneerde dieren is het de vraag hoe de verschillende nationale en internationale overheden hiermee om zullen gaan.

5.1.2 Regelgeving van - en verplichtingen voor - recombinant DNA technologie bij landbouwhuisdieren

5.1.2.1 Transgene dieren

In Nederland geldt geen absoluut verbod op de transgenese van dieren. De regelgeving voorziet in een “Nee - tenzij” beleid. Dit houdt in dat het genetisch modificeren van dieren voor dit doel niet wordt toegestaan als er reële alternatieven zijn om dezelfde producten te maken.

Genetische modificatie van dieren roept bij veel mensen vragen en emoties op. Mogen we alles met dieren doen, wat technisch mogelijk is? De overheid zorgt er echter voor dat niet zomaar alles mag. Genetische modificatie van dieren is verboden, tenzij daar zeer goede argumenten voor zijn. Het doel van het onderzoek waarvoor dieren genetisch worden gemodificeerd moet van substantieel belang zijn voor de mens. Bij de beoordeling van een aanvraag voor een vergunning is dan ook de belangrijkste vraag of de menselijke belangen dusdanig groot zijn dat we daar de gezondheid en welzijn of de integriteit van dieren aan mogen opofferen. In Nederland bestaat geen algemene overeenstemming over wat ethisch aanvaardbaar is. Daarom biedt de procedure voor de vergunningverlening ruimte aan het publiek om hierover mee te praten. Deze procedure moet op termijn resulteren in duidelijke grenzen over wat wel en niet mag bij dit onderzoek.

Een van de bekendste genetisch gemodificeerde dieren is stier Herman. In het genetisch materiaal van stier Herman is een menselijk gen ingebouwd. In vrouwelijke nakomelingen van stier Herman zou dat gen moeten zorgen voor de aanmaak van het eiwit lactoferrine in de melk. Stier Herman heeft de discussie in Nederland over de (on)wenselijkheid van biotechnologie aangewakkerd. Deze discussie heeft bijgedragen aan de totstandkoming van de wetgeving over biotechnologie bij dieren. Indien er sprake is van genetische modificatie ten aanzien van biotechnologische handelingen met dieren, is het Besluit Genetisch Gemodificeerde Organismen (Besluit GGO) op basis van de Wet Milieugevaarlijke Stoffen van toepassing. Indien er sprake is van een dierproef is tevens de Wet op de Dierproeven van toepassing. Op grond van artikel 113 van de Gezondheids- en Welzijnswet voor Dieren zijn beide wetten in dat geval onverkort van toepassing. In het kader van de Wet op de dierproeven wordt getoetst of het belang van de dierproef opweegt tegen de mate van ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend. Op basis van deze wet is bij elk instituut waar dierexperimenten plaatsvinden een dierexperimenten commissies (DEC) ingesteld die de proeven moeten beoordelen op de gevolgen voor de dieren. Hieraan is ook een ethische toetsing gekoppeld. Voor biotechnologie bij dieren is er geen centrale Europese regelgeving. Er zijn wel een aantal staten binnen de EU die enige regelgeving hebben, maar in het algemeen is die minder streng dan de Nederlandse regelgeving.

Het is in principe mogelijk om een IM (introductie in het milieu) vergunning voor genetisch gemodificeerd dieren aan te vragen, net zoals dat ook gebeurt voor planten. Zo is in Nederland een IM vergunning afgegeven voor stier Herman omdat zijn verblijf in het natuurhistorisch museum Naturalis niet voldeed aan de D-I richtlijnen van de Regeling GGO voor ingeperkt gebruik van transgene dieren (in verband met de aanwezigheid van publiek).

De producten van genetisch gemodificeerde dieren zullen zeer waarschijnlijk als zodanig geëtiketteerd moeten worden. Voor zover bekend is hier echter nog geen gebruik van gemaakt.

5.1.2.2 Getherapie en DNA vaccins

Bij de beoordeling van een klinisch getherapie-onderzoek bij mensen kunnen de volgende Nederlandse instanties betrokken zijn:

- De Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO);
- Het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS); en
- Het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu (VROM) en het Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen (BGGO) dat belast is met de afhandeling van vergunningaanvragen, daarbij geadviseerd door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM).

De Minister van VWS beslist over aanvragen op grond van de Wet Medisch-Wetenschappelijk Onderzoek met Mensen (WMO). Sinds het in werking treden van de WMO dient al het getherapie-onderzoek met mensen vanwege het Besluit Centrale Beoordeling Medisch-Wetenschappelijk onderzoek met Mensen (BCB) beoordeeld te worden door de CCMO. De reden dat getherapie-onderzoek door de CCMO – en niet door (lokale) medisch ethische toetsingscommissies – wordt beoordeeld is dat de ontwikkelingen op het terrein van getherapie zo nieuw zijn, dat er sprake is van schaarse deskundigheid op dit gebied.

Het ministerie van VROM is verantwoordelijk voor de regelgeving om mens en milieu te beschermen bij activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) en heeft als taak het ontwikkelen van beleid en regelgeving. De Minister van VROM beslist op vergunningaanvragen op grond van het Besluit GGO.

Getherapie in de strikte betekenis van het woord, dat wil zeggen, het herstellen van een genetisch defect, is waarschijnlijk geen toepassing die veelvuldig gebruikt zal worden voor dieren. Er zijn waarschijnlijk geen dieren die van zoveel individuele waarde zijn dat deze toepassing economisch verantwoord is. Dieren worden wel veel gebruikt als modelsysteem voor getherapeutische toepassingen voor humane ziekten. In deze gevallen betreft het echter vrijwel altijd ingeperkt gebruik.

De toepassing van naakt DNA voor de expressie van heterologe genen in dieren wordt vaak DNA vaccinatie genoemd. In principe zouden we alleen moeten spreken van DNA vaccinatie als de toepassing erop gericht is om een beschermende immuunrespons te induceren tegen een infectieus agens. In alle andere gevallen zouden we moeten spreken over DNA inoculatie. Bij de toepassing van virale vectoren, al dan niet replicatie competent, spreken we over transductie.

Toediening van recombinant DNA aan dieren, hetzij in de vorm van naakt DNA hetzij in de vorm van virale vectoren, valt onder het Besluit GGO en is derhalve gebonden aan de regels voor ingeperkt

gebruik. Momenteel ligt er een voorstel van de COGEM om de regelgeving met betrekking tot de toepassing van naakt DNA te versoepelen. De COGEM is van mening dat het verspreidingsrisico van naakt DNA beperkt is en afhankelijk is van de gebruikte sequenties. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen DNA sequenties die replicatiecompetent en die niet-replicatiecompetent zijn in zoogdiercellen. De eerste groep sequenties vormen een verspreidingsrisico doordat het naakt DNA autonoom kan repliceren. Tot deze categorie behoren ook sequenties waardoor het naakt DNA onderdeel kan gaan uitmaken van virussen, zoals de aanwezigheid van virale inpaksignalen, of waardoor het naakt DNA efficiënt opgenomen kan worden door bacteriën. De COGEM is van mening dat sequenties die behoren tot deze laatste risicogroep, gelet op de aanwezige verspreidingsrisico's, dienen te vallen onder de huidige introductie in het milieu vergunningsprocedure volgens het Besluit GGO.

Met betrekking tot niet-replicatiecompetente sequenties, kunnen twee situaties onderscheiden worden. Tot de eerste situatie behoren sequenties die al eerder beoordeeld zijn en waarvan bekend is dat ze geen verspreidingsrisico vormen. Voor deze sequenties pleit de COGEM voor een procedure waarbij enkel meldingsplicht van de werkzaamheden noodzakelijk is. Echter, monitoring van “shedding” (uitscheiding) blijft noodzakelijk om te controleren of de aannames betreffende “shedding” juist zijn. Tot de tweede situatie behoren sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, maar die mogelijk recombinatie kunnen bevorderen en die kunnen leiden tot het ontstaan van (nieuwe) infectieuze virussen. Tot deze categorie behoren ook sequenties met transformerende of oncologische eigenschappen gezien het mogelijke schadelijke effect van deze sequenties. De COGEM pleit ervoor om, in plaats van de huidige introductie in het milieu procedure, een vereenvoudigde vergunningsprocedure te hanteren voor laatstgenoemde sequenties. Hierbij kan gedacht worden aan een procedure die vergelijkbaar is met de procedure die wordt toegepast bij vergunningen voor ingeperkt gebruik. Deze procedure is tevens van toepassing op sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, maar nog niet eerder zijn beoordeeld.

Als vaccinatie met naakt-DNA niet GGO-regelgevingsplichtig is, zou dat betekenen dat gevaccineerde of geïnoculeerde dieren ook niet onder het GGO-regime vallen. De vraag is hoe de EU over de toepassing van naakt DNA denkt bij producten van dergelijke dieren.

5.1.2.3 Regelgeving voor genetisch gemodificeerd voedsel en diervoeders

Verordening 1829/2003/EC inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en -diervoeders bevat regels betreffende levensmiddelen en diervoeders die geheel of gedeeltelijk uit GGO's bestaan of met GGO's zijn geproduceerd, of ingrediënten bevatten die zijn geproduceerd met GGO's. Genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders mogen volgens de verordening:

- Geen schadelijke effecten hebben op de menselijke gezondheid, de diergezondheid of het milieu;
- De consument niet misleiden; en
- Niet zodanig verschillen van de levensmiddelen of diervoeders ter vervanging waarvan zij zijn bedoeld dat de normale consumptie ervan vanuit voedingsoogpunt nadelig zou zijn voor de consument of de dieren.

Verordening 1830/2003/EC betreffende de traceerbaarheid en etikettering bevat uitgebreide informatie over de etikettering van alle levensmiddelen en diervoeders die geheel of gedeeltelijk uit GGO's bestaan, dan wel ermee zijn geproduceerd. Alle genetisch gemodificeerde levensmiddelen, zoals tofu

dat is geproduceerd met genetisch gemodificeerde soja, en alle genetisch gemodificeerde ingrediënten, zoals biscuit met maïsolie dat met genetisch gemodificeerde maïs is geproduceerd, moeten op het etiket als zodanig worden gekenmerkt. Afhankelijk van de kenmerking als GGO van dieren die bijvoorbeeld zijn geïnculeerd met naakt DNA of transducerende vectoren, zouden de desbetreffende levensmiddelen of diervoeders afkomstig van deze dieren geëtiketteerd dienen te worden.

Overeenkomend met de algemene etiketteringsregels van de EU (Verordening 1831/2003/EC betreffende de traceerbaarheid en etikettering van GGO's en de traceerbaarheid van met GGO's geproduceerde levensmiddelen en diervoeders) schrijft de verordening niet voor dat producten als vlees, melk of eieren die afkomstig zijn van dieren die genetisch gemodificeerd voer hebben gehad of die met genetisch gemodificeerde geneesmiddelen zijn behandeld, geëtiketteerd moeten worden. Onder genetisch gemodificeerde geneesmiddelen wordt hier echter waarschijnlijk alleen bedoeld op geneesmiddelen die met behulp van GGO's geproduceerd zijn en niet zozeer naakt DNA of DNA vaccins.

5.2 Mogelijke consequenties voor veiligheidsbeleid en regelgeving

De huidige nationale en internationale regelgeving is nog niet aangepast voor het regelen van een aantal mogelijke toekomstige DNA technologieën bij landbouwhuisdieren. Ofschoon in de bestaande regelgeving de toepassing van DNA technologieën bij landbouwhuisdieren redelijk goed is vastgelegd, wordt niet of nauwelijks aandacht besteed aan vervolgtoeepassingen, bijvoorbeeld het fokken met transgene dieren, of het gebruik van producten van transgene dieren of van dieren die een andere DNA technologische behandeling hebben ondergaan.

Terwijl de regels en procedures voor de toelating kunnen verschillen tussen de verschillende jurisprudenties, is de beoordeling van de veiligheid per se gebaseerd op international geharmoniseerde benadering voor de “vergelijkende veiligheidsbeoordeling” van GGO's. Hierin wordt het GGO met een conventionele tegenhanger met een geschiedenis van veilig gebruik vergeleken (Kok en Kuiper, 2003). Deze beoordeling beschouwt de volgende zaken:

- Veiligheid van het ingebrachte genetisch materiaal en genproducten: Hierbij worden onder ander details over de modificatie zelf, algemene details over structuur en functie van nieuw ingebrachte producten, mogelijke toxiciteit en allergeniciteit van ingebrachte transgene eiwitten, mogelijkheid tot horizontale overdracht naar andere organismen van de nieuwe genen, beschouwd. Eén van de eerste stappen hierin is een uitgebreide vergelijkende analyse tussen GGO en conventionele tegenhanger, onder andere met betrekking tot samenstelling, fenotypische/agronomische kenmerken. De samenstellingsanalyse omvat een groot aantal macronutriënten, micronutriënten, antinutriënten en toxines. Omdat elk organisme van een ander verschilt zullen de parameters van deze analyse ook verschillen.
- Veiligheid van mogelijke andere veranderingen die door de genetische modificatie teweeg zijn gebracht: Dit kan secundaire effecten van de modificatie betreffen, zoals onbedoelde effecten van de insertie van DNA in een bestaand gen of de interactie van een ingebracht enzym met bestaande routes van metabolisme. De uitgebreide vergelijkende analyse kan uitsluitsel geven over dergelijke effecten. Daarnaast kunnen gegevens over de genetische modificatie zelf, zoals insertieplaats in het DNA en de functie van de genproducten, hiervoor ook indicaties leveren.

De Amerikaanse Food and Drug Administration heeft recentelijk documenten met betrekking tot de risico's van kloneren door somatische celkerntransfer voor publiekelijk commentaar op haar website geplaatst. Deze documenten gaan expliciet niet in op transgenese, maar focussen op de mogelijke veranderingen die door klonering kunnen ontstaan, vooral afwijkingen door niet-optimale herprogrammering van de celkern na de transfer. Op basis van de beschikbare gegevens over onder andere de fysiologie en samenstelling van gekloneerde dieren concludeert de Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA) dat er geen veiligheidsbezwaren verbonden lijken te zijn aan voedingsmiddelen afkomstig van gekloneerde dieren (FDA, 2006).

Tot nu toe zijn voor commerciële toelating van GGO's in de EU vooral genetisch gemodificeerde planten beoordeeld, naast verschillende producten die door microorganismen geproduceerd zijn. Hoewel in grote lijnen dezelfde principes voor de beoordeling van genetisch gemodificeerde dieren gebruikt kunnen worden, zijn er een aantal zaken dat meer of minder aandacht zal krijgen. Het aantal giftige/antinutritionele stoffen die in dierlijke voedingsproducten kan voorkomen is bijvoorbeeld minder groot dan in planten. Een voorbeeld van een dergelijk stof in vis is het enzym thiaminase, dat vitamine B afbreekt, en dat in sommige vissen, waaronder haring, veel voorkomt. Voor wat betreft de veiligheid van het gebruikte DNA kan worden aangenomen dat antibioticum resistentie genen minder toegepast zullen worden waardoor het vraagstuk van horizontale genoverdracht een minder grote rol speelt. Anderzijds is er bij gebruik van virussen als vectoren wel een vraagstuk met betrekking tot mogelijke recombinatie met andere virussen en daardoor het ontstaan van nieuwe virussen. Ook kunnen dieren een reservoir voor zoonoses zijn en zou bij toepassing van een transgene resistentie voor een dergelijke zoonose rekening moeten worden gehouden met de mogelijke overdracht van het zoönotische pathogeen naar de menselijke consument (Kleter en Kuiper, 2002).

Naast deze mogelijke veiligheidsissues voor gezondheid van dier en consument lijken milieu-risico's een grote rol te spelen in de discussie over de pre-commerciële snel groeiende kweekzalm. Dit is het genetisch gemodificeerd dierlijk product dat waarschijnlijk binnenkort op de markt zal komen. De milieurisico's houden vooral verband met de mogelijke vermeerdering en verdringing van de natuurlijke populatie bij ontsnapping tijdens de zalmkweek. Vermeldenswaardig is ook dat de Verenigde Staten het ingebouwde groeihormoon in deze zalm als een veterinaire geneesmiddel beschouwen en beoordelen, naast de andere risico's. De Nederlandse Commissie Genetische Modificatie, dat de milieurisico's bij GGO-toelatingsaanvragen beoordeelt, heeft hierover bijvoorbeeld een vooruitziend advies uitgebracht (COGEM, 2003).

De modificaties hebben ook consequenties voor andere zaken zoals dierenwelzijn, ethische aspecten, traceerbaarheid en dergelijke, die onder verschillende wetten gereguleerd zijn. In dit opzicht verschilt het van de regelgeving met betrekking tot genetisch gemodificeerde planten, waarop overigens ook andere wetten van toepassing kunnen zijn, zoals voor plantenrassenregistratie en bestrijdingsmiddelenregistratie. Veel ervaring is al opgedaan in Nederland met proefdieren in het kader van de Nederlandse Wet op Biotechnologie bij dieren. Voor genterapie en klonering is bijvoorbeeld ook de embryowet van toepassing. De vraag is in hoeverre deze ervaring zich laat vertalen naar landbouwhuisdieren. Het "nee tenzij" principe dat voor proefdieren is aangehouden zou voor de toepassing bij landbouwhuisdieren kunnen betekenen dat een aantal toepassingen, zoals productieverhoging, geen doorgang zullen vinden. De reden hiervoor is dat het doel van de genetische modificatie mogelijk niet als maatschappelijk zwaarwegend ervaren kan worden en er alternatieven

voorhanden zijn. Daarentegen zouden resistenties tegen bedreigende ziektes voor mens en dier, zoals BSE, mogelijk wel volgens dit principe acceptabel geacht kunnen worden. Overigens constateert een rapport van het Rathenau instituut uit 2001 dat de grens hiervoor niet duidelijk is vastgelegd (Paula, 2001). Rekening dient bijvoorbeeld ook gehouden te worden met het gegeven dat een bepaalde infrastructuur voor proefdieren (afgesloten faciliteiten, interne biologische veiligheidsfunctionaris, ethische toetsingscommissies, en dergelijke) niet in de landbouw aanwezig is en vice versa.

Een ander punt van aandacht is de publieke reactie op biotechnologie bij landbouwhuisdieren. Onder andere in de peiling voor de Brede Maatschappelijke Discussie is gebleken dat er in het algemeen geen positieve perceptie van het gebruik van gentechnologie voor productie van dieren bestaat, terwijl bijvoorbeeld de Eurobarometer laat zien dat therapeutische toepassingen van biotechnologie wel goed ontvangen worden (Gaskell et al., 2006).

6 Toekomstige ontwikkelingen

6.1 Achtergrond

6.1.1 *Internationale harmonisering van de regelgeving*

De wijze waarop de veiligheidsbeoordeling van gentechnologische producten wordt uitgevoerd wordt in grote mate bepaald door de internationale organisaties, die sinds zich lange tijd ingezet hebben voor de harmonisatie hiervan. Deze internationale organisaties zijn onder andere de wereldlandbouworganisatie FAO (Food and Agriculture Organization), de wereldgezondheidsorganisatie WHO (World Health Organization), de Codex alimentarius commissie van de FAO/WHO, en de organisatie voor economische samenwerking en ontwikkeling OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Tot de OECD behoren veel westerse landen waar in de toekomst de biotechnologie een belangrijke economische rol kan spelen. Het geharmoniseerde principe van de vergelijkende veiligheidsbeoordeling, waarin de relatieve veiligheid van een GGO ten opzichte van een conventionele tegenhanger met een geschiedenis van veilig gebruik wordt vergeleken, is in 1993 bijvoorbeeld door OECD beschreven. Dit is later, in 2003, vastgelegd in richtlijnen van een ander belangrijk internationaal forum voor voedselveiligheid, namelijk de Codex alimentarius commissie, een VN orgaan voortkomend uit de WHO en FAO. Binnen de Codex worden tal van normen en eisen voor veiligheid en kwaliteit geformuleerd waar voedselproducten wereldwijd aan zouden moeten voldoen. Deze documenten gelden als referentie voor de wereldhandelsorganisatie WTO (World Trade Organization) en dienen daarom ook in de nationale regelgeving van de Codex lidstaten te worden overgenomen. Momenteel is er een document over de veiligheid van voedselproducten van dierlijke producten afkomstig van gekloneerde en genetisch gemodificeerde dieren in een vergevorderde staat van voorbereiding.

Er zijn echter nog geen internationale richtlijnen om genetisch gemodificeerde producten te etiketteren afgezien van diegenen die als internationaal verhandelde “levend gemodificeerde organismen” onder het Cartagena protocol vallen (zie onder). Dit verklaart bijvoorbeeld waarom de Verenigde Staten en de EU niet dezelfde regels voor etikettering hebben, namelijk geen verplichting in de Verenigde Staten maar wel in de EU.

Sinds 11 september 2003 is er een internationaal verdrag over biologische veiligheid van kracht: het Cartagena Protocol on Biosafety. Het Biosafety Protocol is een VN verdrag dat de handel in levende gemodificeerde organismen regelt. Het Biosafety Protocol gaat over levende GGO's en dus niet over verwerkte producten zoals meel, olie, etcetera. De kern van het verdrag is dat bij grensoverschrijdend verkeer met GGO's het importerende land van tevoren toestemming moet geven. Ook dient het exporterende land de beweging van het GGO bij een internationaal “clearinghouse” te registreren, inclusief gegevens over het GGO, waaronder de modificatie en methoden voor detectie. Het gaat dan vooral om GGO's die bedoeld zijn voor veldproeven of voor gebruik in de landbouw. Genetisch gemodificeerde organismen die bedoeld zijn voor direct gebruik als voedsel vallen er niet onder.

6.1.2 EU regelgeving

Nederland volgt in grote lijnen de EU wetgeving over gentechnologie. Deze is onderverdeeld in diverse richtlijnen. Zo is er een richtlijn voor ingeperkt gebruik en een richtlijn introductie van GGO's in het milieu, zoals landbouwgewassen. Ook is er een verordening over etikettering. Veel van de OECD richtlijnen zijn overgenomen in de EU wetgeving. In de meeste ontwikkelingslanden ligt de situatie anders. Daar ontbreekt het vaak nog aan wet en regelgeving of is er wel regelgeving maar ontbreken de instrumenten om die te handhaven. Zo hebben veel landen niet de benodigde laboratoria om te kunnen onderzoeken of er GGO's in voedselproducten zitten.

6.2 Verwachte ontwikkelingen

De volgende ontwikkelingen in de nabije toekomst zullen waarschijnlijk een effect hebben op de regelgeving en detectie van toepassing van moderne biotechnologie in landbouwhuisdieren:

- Wetenschappelijke vorderingen:
 - Verbeterde en nieuwe technieken voor DNA modificatie bij dieren: Het is te verwachten dat er de komende tijd nog flinke progressie geboekt zal worden bij de efficiëntie en nauwkeurigheid van een groot aantal van de in dit rapport beschreven technieken. Dit betreft onder andere de efficiëntie van DNA transfers in vivo en in vitro, de nauwkeurigheid ervan (integratie van vreemd DNA op gewenste plaats in het genoom) en de succesrates van kerntransplantaties. De technieken om de expressie van genen te moduleren (onder andere via RNAi) staan nog in de kinderschoenen en zullen zich verder ontwikkelen. Ook op het terrein van de in vivo “cell-targeting” (het binnenbrengen van “vreemd” DNA in specifieke cellen in het lichaam) zullen grote sprongen voorwaart gemaakt worden. De kosten voor het genereren van zeer uitgebreide “omics” datasets (>500.000 datapunten per meting) zullen snel teruglopen. De integratie van “omics” met het werkveld van de bionanotechnologie zal leiden tot de ontwikkeling van “bio-devices” (“lab-on-a-chip,” sensoren die in vivo tientallen biologische parameters tegelijk kunnen monitoren, etcetera) die voor uiteenlopende doelen toegepast kunnen worden. Een additioneel voordeel is dat dergelijke methoden ook toepasbaar kunnen zijn voor meting van “biomarkers” voor diergezondheid, waardoor er mogelijk een integratie van het testen voor verschillende doeleinden in één test mogelijk is.
 - Toepassing bij diersoorten die tot nu toe onderbelicht zijn geweest: Tot nu toe wordt er binnen het pluimvee nog weinig aandacht besteed aan moderne biotechnologie. Daar zijn een aantal redenen voor te noemen. Ten eerste is het moeilijker om het embryo te bereiken door de eischaal en de vliezen. In vitro fertilisatie is niet mogelijk. Daarnaast is de waarde van het individuele dier laag. Een eigenschap zou in een populatie ingebracht moeten worden, tegen heel lage kosten, om economisch interessant te kunnen zijn. Er wordt melding gemaakt van het transgeen maken van kippen om resistentie tegen “Newcastle disease” (NCD) te bewerkstelligen. Afhankelijk van hoe deze resistentie werkt, moet worden afgewogen in hoeverre dat een nuttige ontwikkeling zou zijn aangezien het virus door zal evolueren tot het weer succesvol is. Andere eigenschappen, als verbeterde groei, zijn in pluimvee van minder belang omdat de dieren al dusdanig geselecteerd zijn dat ze hard groeien. Anderzijds, als de gezondheidsproblemen die bij de dieren optreden door deze snelle groei, zelf het doel van modificaties zijn om de diergezondheid te vergroten, zou dit de dierproductie op een acceptabele manier verder kunnen verhogen. Door selectie is in betrekkelijk korte tijd veel te

bereiken, tenzij de betreffende genen nog niet in de populatie aanwezig zijn. Indien het mogelijk zou zijn om via transgenese dieren te ontwikkelen die resistent zijn tegen bepaalde infecties die nu voor veel economische schade zorgen, en indien die transgene resistentie bestendig is tegen co-evolutie van de pathogeen, dan zou daar zeker interesse voor zijn. Maar alleen als het tegen aantrekkelijke kosten per dier te realiseren is.

- Commercialisering en experimenteel vergevorderde applicaties:
 - Medicijnen en non-food afkomstig van GGO-dieren: In de EU is in 2006 door het Europees Agentschap voor Evaluatie van Geneesmiddelen (EMA) het geneesmiddel Atryn goedgekeurd. Dit geneesmiddel bevat antithrombine ten behoeve van patiënten met een afwijkende bloedklontering. Dit is de eerste Europese goedkeuring van een geneesmiddel dat door transgene geiten in de melk wordt uitgescheiden en vervolgens daaruit gezuiverd wordt. Een punt van aandacht bij de beoordeling is onder andere de mogelijk gewijzigde immunogeniteit van het eiwit geweest, omdat de glycosylering van het antithrombine enigszins verschilde van die in de mens (Walsh, 2006).
Een andere toepassing in de medische sector is dat van transgene dieren voor xenotransplantatie, dat wil zeggen de transplantatie van een orgaan van één soort naar een andere (xeno = vreemd). Een firma claimt dat het verschillende vormen van afstoting van een getransplanteerd orgaan uit varkens door het immuunsysteem van de ontvanger kan voorkomen. Doordat deze firma verschillende genetische modificaties heeft toegepast, worden bijvoorbeeld de suikerketens op de cellen van de varkensorganen niet meer als vreemd herkend. Additionele modificaties dienen voor de preventie van langer durende problemen met bijvoorbeeld interne bloedingen en infiltratie van witte bloedcellen (Revivicor, 2009).
Naast medische toepassingen zijn ook non-food toepassingen gemeld. Dit betreft onder andere de productie van spinnenzijde voor nanotechnologische toepassingen en een humaan enzym als antidoot voor zenuwgif, beiden uit melk van transgene geiten (Nexia, 2009).
Een additioneel voorbeeld van een gevorderd transgeen dier is een varken, de EnviroPig™, dat een verminderde excretie heeft van fosfaat via varkensmest. Fosfaat in het milieu, bijvoorbeeld in oppervlaktewater, draagt bij aan eutrofiëring, dat op zijn beurt ongewenste algengroei tot gevolg kan hebben. De EnviroPig™ is genetisch gemodificeerd met een fytinezuur-afbrekend enzym, fytase, dat in de speekselklieren wordt uitgescheiden. Fytinezuur is een koolhydraat waaraan fosfaatgroepen covalent gebonden zijn waardoor deze niet voor opname door vertering beschikbaar zijn en dus via de mest worden uitgescheiden. Ook bindt fytinezuur essentiële mineralen (metalen) waardoor deze evenmin kunnen worden opgenomen (Universiteit van Guelph, 2009).
 - Buiten de EU bevinden de volgende ontwikkelingen zich in een vergevorderd stadium van ontwikkeling:
 - Snelgroeiende GGO-kweekvissen. De met groeihormoon gewijzigde Aquadvantage™ kweekzalm is enkele jaren geleden bij de Amerikaanse FDA aangemeld voor commercialisering. Deze zalm vertoont een snellere groei, maar heeft echter dezelfde volwassen grootte als een conventionele zalm. De GGO-zalm heeft een beter voederefficiëntie, en heeft dus minder voer nodig voor dezelfde productie. De FDA evaluatie is nog niet voltooid, terwijl de fabrikant in een persbericht op de website de verwachting heeft uitgesproken dat deze zalm in 2009 op de markt zal komen (dit bericht is inmiddels van de website verwijderd; Aquabounty, 2006). Naast deze zalm is er

bijvoorbeeld ook in de Volksrepubliek China een sneller groeiende rivierkarper ontwikkeld, en in Cuba een tilapia, beiden genetisch gemodificeerd met groeihormonen.

- Gekloneerde dieren. Zoals boven al opgemerkt heeft onlangs de Amerikaanse FDA concept documenten gepubliceerd over de veiligheid van gekloneerde runderen, varkens, en geiten (FDA, 2006). In haar concept beoordeling gaat de FDA er overigens vanuit dat de klonen niet als eindproduct (slachtdier en dergelijke) maar voor de veefokkerij gebruikt zullen worden. De publicatie van de FDA documenten is de uitkomst van een langduriger proces dat in 2001 in gang gezet is nadat de FDA constateerde dat commerciële instellingen klonen hadden ontwikkeld voor het fokken van landbouwhuisdieren. In de tussentijd zijn er inmiddels ook mediaberichten verschenen over bijvoorbeeld gekloneerde koeien op een commercieel agrarisch bedrijf, waarvan de melk overigens niet verkocht is (MSNBC, 2006).
- Mogelijk illegaal gebruik:
 - Voor wat betreft een mogelijke illegale toepassing van moderne biotechnologie, zo lijkt de toepassing van humane gentherapie of humane gendoping op dieren een lagere drempel te hebben dan bijvoorbeeld genetische modificatie via de kiembaan. Momenteel zijn er drie humane gentherapieën op de markt toegelaten, namelijk twee voor therapie van oogafwijkingen in de Verenigde Staten en één voor behandeling van kanker in combinatie met bestraling (Walsh, 2006).). Andere in ontwikkeling zijnde toepassingen van gentherapie zouden zich ook kunnen lenen voor de doping in de sport of de productie van landbouwhuisdieren, zoals de hierboven besproken therapie van bloedarmoede met genen voor erythropoetine (EPO). Daarentegen lijken gentherapieën met groeihormoon in een minder gevorderd stadium te zijn. Met name in aanloop naar de Olympische Spelen is gespeculeerd over het mogelijk gebruik van gendoping in de sport. Zoals boven besproken hebben ook de internationale en nationale dopingautoriteiten als het WADA deze problematiek beschouwd. Hierin zijn onder andere de mogelijke consequenties voor gezondheid en detectie beschouwd, zoals het ontbreken van beschermende maatregelen en de noodzaak om te monitoren via het regelmatig maken van eiwitprofielen van de sporters. Deze aanbevelingen zijn ook relevant voor landbouwhuisdieren, waarbij echter ook andere overwegingen van economische aard een beperkende factor kunnen spelen.
- Internationale harmonisering van regelgeving en detectie:
 - De Codex alimentarius “Task Force on Foods derived from Biotechnology” heeft een concept richtlijn opgesteld voor de veiligheidsbeoordeling van genetisch gemodificeerde dieren voor toepassing in voeding. Dit document is door de Codex alimentarius commissie aangenomen bij de vergadering van deze commissie in juli 2008 (Codex alimentarius, 2008). Daarnaast heeft een werkgroep van dezelfde Task Force voor het Codex comité voor analyse- en monsternamen-methodes een concept document opgesteld met vereisten voor GGO-detectie methoden. Een begeleidend overzicht noemt verschillende GGO’s waarvoor gevalideerde detectiemethoden bestaan, onder andere voor met groeihormoon genetisch gemodificeerde coho zalm. Deze methode is door de Duitse overheid ontwikkeld (Codex alimentarius, 2002).
 - Op basis van een pro-actieve verkenning van de biotechnologische ontwikkelingen in China, heeft de Nederlandse COGEM een project gefinitieerd voor een verkenning van gentherapie in China. Dit is mede op basis van de hierboven vermelde toelating in China van een humane gentherapie tegen kanker. Aanleiding hiervoor is de mogelijke consequenties hiervan voor gentherapie in Nederland en Europa.

- Naast controle en regelgeving van genetisch gemodificeerde dieren die binnen Nederland en de EU ontwikkeld worden dient ook met de mogelijke import van elders gebruikte dieren rekening gehouden te worden. Dit dient ook in het licht van de globalisering van de handel en transport gezien te worden, waarbij Nederland als belangrijke toegangspoort voor de EU dient. Detectiemethoden ten behoeve van handhaving en controle zullen hierbij ook een belangrijke rol gaan spelen, analoog aan de import van genetisch gemodificeerde gewassen en afgeleide producten.

7 Aanbevelingen

Op basis van hetgeen in de bovenstaande secties 1 tot en met 5 besproken is, zijn de volgende aandachtsgebieden geïdentificeerd:

- Definitie van een kloon als GGO of niet: Richtlijn 2001/18/EC voor milieu-introductie van GGO's geeft een definitie van GGO's en noemt onder andere technieken van genetische modificatie, waaronder bijvoorbeeld het met micro-injectie inbrengen van extern genetisch materiaal. Echter, klonering door kerntransfer wordt blijkbaar niet door de overheden als een genetisch modificatie beschouwd. Eenduidige voorschriften zouden deze situatie kunnen verhelderen.
- In meer algemene zin zou het nuttig zijn om de mogelijke "blinde vlekken" te identificeren in nationale en internationale regels ten aanzien van het produceren en verhandelen van nieuwe transgene en/of gekloneerde landbouwhuisdieren en daarvan afkomstige producten.
- Mogelijke consequenties van homogenere populaties door klonering: Hoewel een homogenere genetische achtergrond niet alleen door klonering bereikt kan worden, wordt het als één van de sterke punten ten aanzien van een consistentere kwaliteit van de producten van gekloneerde dieren aangehaald. Daarentegen rijzen vragen met betrekking tot de mogelijk snellere verspreiding van ziektes. Een inventarisatie van de voor- en na-delen zou nuttig zijn.
- Detectiemogelijkheden voor individuele dieren in een populatie van gekloneerde dieren of afstammelingen daarvan: EU regelgeving schrijft voor dat landbouwhuisdieren die gebruikt worden voor vleesproductie traceerbaar dienen te zijn. Indien dieren echter over hetzelfde genetische materiaal beschikken vervalt één van de mogelijkheden om hen van elkaar te onderscheiden. Daarnaast zou het wenselijk kunnen zijn om klonen van niet-gekloneerde dieren te kunnen onderscheiden. Methoden hiervoor zijn nog niet beschikbaar en het verdient daarom aanbeveling de mogelijkheden hiervoor te verkennen.
- De literatuur over genterapie bij landbouwhuisdieren is beperkt, terwijl er daarentegen veel op humaan medische gebied en in laboratoriumdieren onderzocht is. Het is niet onwaarschijnlijk dat interessante toepassingen van moderne biotechnologie in mens en proefdier ook illegaal in landbouwhuisdieren zouden kunnen worden toegepast, analoog aan het gebruik van prestatiebevorderende middelen in sportdoping en vlees- en melk-vee. Dit zal consequenties hebben voor veiligheid en detectie. Nieuwe methoden voor detectie van gendoping die door antidopingautoriteiten voor toepassing in de sport aanbevolen zijn, of mogelijk al toegepast worden, zouden ook op hun toepasbaarheid in landbouwhuisdieren getest te worden.
- Er is een kans op mogelijke import van genetisch gemodificeerde dieren en afgeleide importen vanuit landen waar genetisch gemodificeerde dieren gebruikt zullen worden. In principe zouden deze dieren onder het Cartagena Protocol bij het Biosafety Clearinghouse aangemeld dienen te worden. Om te anticiperen op situaties waar dit echter niet het geval zal zijn, zou het nuttig zijn om hiervoor voorbereidingen te treffen door het volgen van ontwikkelingen wereldwijd plus het ontwerpen van detectiemethoden die hiervoor geschikt zijn.
- Deze aanbeveling vult de vorige aanbeveling om voorbereid te zijn op mogelijke import van genetisch gemodificeerde dieren aan. In meer detail zou namelijk een begin gemaakt kunnen worden met het aanleggen van een database met daarin mRNA en eiwitexpressie profielen van gezonde en "gedrogeerde" dieren (aan de slachtlijn). Dit dient het volgende tweeledige doel: 1) identificatie van de variatie binnen de populaties en 2) het opbouwen van een referentie set voor

eventueel te ontwikkelen gendoping testen. Bovendien zou het ook nuttig zijn om een inventarisatie uit te voeren van genen die middels gendoping op basis van theoretische gronden en publicaties in de literatuur kunnen bijdragen aan de kwaliteit en/of kwantiteit van het dierlijke eindproduct.

8 Literatuur

- AquaBounty. 2006. Aquadvantage™ Broodstock Program. Waltham MA: AquaBounty.
- Arany Z, Lebrasseur N, Morris C, Smith E, Yang W, Chin S, Spiegelman BM. 2007. The transcriptional co-activator PGC-1 β drives the formation of oxidative type II X fibers in skeletal muscle. *Cell Metabolism* 5:35-46. doi:10.1016/j.cmet.2006.12.003
- Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH. 2005. Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies. *Clinical Biochemistry* 38:959-965. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.09.007
- Bellinge RHS, Liberles DA, Laschi SPA, O'Brien PA, Tay GK. 2004. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal Genetics* 36:1-6. doi:10.1111/j.1365-2052.2004.01229.x
- Brem G, Wanke R, Wolf E, Buchmuller T, Muller M, Brenig B, Hermanns W. 1989. Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Molecular Biology and Medicine* 6:531-47.
- Brent AE, Tabin CJ. 2004. White meat or dark? *Nature Genetics* 36:8-10. doi:10.1038/ng0104-8
- Campbell KHS, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly RDW, Lee J-H, Maalouf W. 2005. Cloning: Eight years after Dolly. *Reproduction in Domestic Animals* 40:256-268. doi:10.1111/j.1439-0531.2005.00591.x
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Implications of cloning. *Nature* 380(6573):383. doi:10.1038/380383a0
- Cavazzano-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. 2004. The future of gene therapy. *Nature* 427(6977):779-781. doi:10.1038/427779a
- CDC. 2005. CDC and Fort Dodge Animal Health Achieve First Licensed DNA Vaccine (Persbericht 18 juli 2005). Atlanta GA: Centers for Disease Control and Prevention. Online verkrijgbaar van <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r050718.htm>. Toegang verkregen op 9 april 2009.
- Chenuaud P, Larchet T, Rabinowitz JE, Provost N, Cherel Y, Casadevall N, Samulski RJ, Moullier P. 2004. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 103:3303-3304. doi:10.1182/blood-2003-11-3845. Online verkrijgbaar van <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/103/9/3303>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Codex alimentarius. 2002. Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Food derived from Biotechnology, Third Session, Yokohama, Japan, 4-8 March 2002, Consideration of Analytical

Methods. Rome: Codex alimentarius. Online verkrijgbaar van ftp://ftp.fao.org/codex/ccfbt3/bt02_09e.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009.

Codex alimentarius. 2008. Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods derived from Recombinant-DNA Animals (CAC/GL 68-2008). Rome: Codex alimentarius. Online verkrijgbaar van http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11023/CXG_068e.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009

COGEM. 2003. Transgene zalm, een veilig produkt? De risico's voor het milieu bij productie van transgene zalm (031124-01). Bilthoven: Commissie Genetische Modificatie. Online verkrijgbaar van <http://www.cogem.net/main-adviesdetail-home.aspx?id=195>. Toegang verkregen op 9 april 2009

Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, De Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. 2001. Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nature Biotechnology* 6:559-562. doi:10.1038/89313

Devlin RH, Yesaki TY, Biagi CA, Donaldson EM, Swanson P, Chan WK. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371:209-210. doi:10.1038/371209a0

Devlin RH, D'Andrade M, Uh M, Biagi CA. 2004. Population effects of growth hormone transgenic coho salmon depend on food availability and genotype by environment interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9303-9308. doi:10.1073/pnas.0400023101

Diel P, Schiffer T, Adler M. 2005. High Sensitive Detection of Genetically and Pharmacological Manipulations of the Myostatin Signal Transduction Pathway by Multiplex Immuno PCR Fingerprint Analysis. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/dIEL.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009

Dikeman ME. 2007. Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality. *Meat Science* 77:121-135. doi:10.1016/j.meatsci.2007.04.011

Dobrinski I. 2007. Transplantation of germ cells and testis tissue for the study and preservation of fertility. In: Roldan E, Gomendio M, editors. *Spermatology (Society of Reproduction and Fertility Supplement 65)*. Nottingham: Nottingham University Press. ISBN 978-1-904761-48-8. pp. 447-458.

Dobrinski I, Travis AJ. 2007. Germ cell transplantation for the propagation of companion animals, non-domestic and endangered species. *Reproduction, Fertility and Development* 19:732-739. doi:10.1071/RD07036

Doherty MK, Beynon RJ, Whitfield PD. 2008. Proteomics and naturally occurring animal diseases: Opportunities for animal and human medicine. *Proteomics Clinical Applications* 2:135-141. doi:10.1002/prca.200780085

- Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, Jones S, Haynes JR, Dean HJ. 2006. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine* 24:4475-4481. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.012
- Dudek T, Knipe DM. 2006. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 344:230-239. doi:10.1016/j.virol.2005.09.020
- FDA. 2006. FDA Issues Draft Documents on the Safety of Animal Clones. Agency Continues to Ask Producers and Breeders Not to Introduce Food from Clones into Food Supply. Press Release P06-215, 28 December 2006. Washington DC: Food and Drug Administration. Online verkrijgbaar van <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01541.html>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Ferrera F, La Cava A, Rizzi M, Hahn BH, Indiveri F, Filaci G. 2007. Gene vaccination for the induction of immune tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1110(Autoimmunity, Part B: Novel Applications of Basic Research):99-111. doi:10.1196/annals.1423.012
- Filipp F. 2007. Is science killing sport? Gene therapy and its possible abuse in doping. *EMBO reports* 8:433-435. doi:10.1038/sj.embor.7400968
- Freking BA, Murphy SK, Wylie AA, Rhodes SJ, Keele JW, Leymaster KA, Jirtle RL, Smith TPL. 2002. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Research* 12:1496-1506. doi:10.1101/gr.571002
- Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, Grant R, Calcedo R, McCullough B, Bagg A, Zhang Y, Wilson JM. 2004. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* 103:3300-3302. doi:10.1182/blood-2003-11-3852. Online verkrijgbaar van <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/103/9/3300>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45:141-152. doi:10.1016/0093-691X(95)00363-D
- Gaskell G, Stares S, Allansdottir A, Allum N, Corchero C, Fischler C, Hampel J, Jackson J, Kronberger N, Mejlgaard N, Revuelta G, Schreiner C, Torgersen H, Wagner W. 2006. Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends. Final report on Eurobarometer 64.3. Brussels: European Commission. Online verkrijgbaar van http://www.ec.europa.eu/research/biosociety/pdf/eb_64_3_final_report_second_edition_july_06.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Gmeiner G, Nohammer C, Bachl N. 2005. Application of Microarray Technology for the Detection of Changes in Gene Expression after Doping with Recombinant Human Growth Hormone. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/c1_2003.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009

- Goldspink G, Harridge S, Bouloux P, Bottinelli R. 2003. Manipulation of Muscle Mass via the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor Axis. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Goldspink_2001_growth.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009.
- Haisma HJ, De Hon O, Sollie P, Vorstenbosch J. 2004. Genetische Doping. Capelle a/d IJssel: Nederlands Centrum voor Dopingvraagstukken NECEDO. Online verkrijgbaar van http://www.nvgt.nl/gene_dope.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Haisma HJ, De Hon O. 2006a. Gene doping. *International Journal of Sports Medicine* 27:257-266. doi:10.1055/s-2006-923986
- Haisma HJ, De Hon O. .2006b. Genetische doping. *Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde* 31:19-21. Online verkrijgbaar van <http://www.nvkc.nl/publicaties/documents/2006-1-p19-21.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentina-Silva F, Nye CK, Cabrera ME, Hagen DR, Utter CB, Baghdy Y, Johnson DH, Wilson DL, Kirwan JP, Kalhan SC, Hanson RW. 2007. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *Journal of Biological Chemistry* 282:32844-32855. doi:10.1074/jbc.M706127200
- Hallerman EM, McLean E, Fleming IA. 2007. Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs. *Applied Animal Behaviour Science* 104:265-294. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.008
- Harper GS, Brownlee A, Hall TE, Seymour R, Lyons R, Ledwith P. 2003. Global Progress toward Transgenic Food Animals: a Survey of Publicly Available Information. St. Lucia (Qld.): CSIRO Livestock Industries. Online verkrijgbaar van http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Transgenic%20Livestock%20Review%20CSIRO%20FINAL%2012Dec20031.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51:1451-1465. doi:10.1016/S0093-691X(99)00089-8
- Ho KK, Nelson A, Kaplan W, Leung, K-C, Handelsman D. 2005. Detection of Growth Hormone Doping by Gene Expression Profiling of Peripheral Blood Cells in Humans. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Prof-Ho.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. 2006. Maintenance of chicken embryonic stem cells in vitro. *Methods in Molecular Biology* 329(Embryonic Stem Cell Protocols, Vol. I: Isolation and Characterization):17-34.

- Hubbard TJ, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, Down T, Dyer SC, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Graf S, Haider S, Hammond M, Herrero J, Holland R, Howe K, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Melsopp C, Megy K, Meidl P, Ouverdin B, Parker A, Prlic A, Rice S, Rios D, Schuster M, Sealy I, Severin J, Slater G, Smedley D, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wood M, Cox T, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Kasprzyk A, Proctor G, Searle S, Smith J, Ureta-Vidal A, Birney E. 2007. Ensembl 2007. *Nucleic Acids Research* 35(Database issue):D610-617. doi:10.1093/nar/gkl996. Online verkrijgbaar van http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/35/suppl_1/D610. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Humphray SJ, Scott CE, Clark R, Marron B, Bender C, Camm N, Davis J, Jenks A, Noon A, Patel M, Sehra H, Yang F, Rogatcheva MB, Milan D, Chardon P, Rohrer G, Nonneman D, de Jong P, Meyers SN, Archibald A, Beever JE, Schook LB, Rogers J. 2007. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biology* 8:R11 (Epub ahead of print). doi:10.1186/gb-2007-8-7-r139. Online verkrijgbaar van <http://genomebiology.com/2007/8/7/R139>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Jorgensen JO, Kopchick JJ. 2006. Proteomic Analysis of Serum Exposed to GH: a Future Assay for Detection of GH Doping. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Jorgensen_2006_3.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Keefe CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. 2007. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Animal Reproduction Science* 98:147-168. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.10.009
- Kleter GA, Kuiper HA. 2002. Considerations for the assessment of safety of genetically modified animals used for human food or animal feed. *Livestock Production Science* 74:275-285. doi:10.1016/S0301-6226(02)00019-2
- Koert W. 2003. De hormoonoorlog als testcase. *Wb - Wageningen Universiteitsblad* (25 september 2003):6.
- Kok EJ, Kuiper HA. 2003. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in Biotechnology* 21:439-444. doi:10.1016/j.tibtech.2003.08.003
- Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I, Robl JM. 2002. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nature Biotechnology* 20:889-894. doi:10.1038/nbt727
- Labrie F, Luu-The V, Calvo E, Martel C, Cloutier J, Gauthier S, Belleau P, Morissette J, Lévesque M-H, Labrie C. 2005. Tetrahydrogestrinone induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid. *Journal of Endocrinology* 184:427-433. doi:10.1677/joe.1.05997

- Lasne F, Martin L, De Ceaurriz J, Larcher T, Moullier P. 2004. "Genetic doping" with erythropoietin in primate muscle is detectable. *Molecular Therapy* 10:409-410. doi:10.1016/j.ymthe.2004.07.024
- Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. 2004. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *Journal of Applied Physiology* 96:1097-1104. doi:10.1152/jappphysiol.00479.2003
- Lee S-J. 2007. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF- β signaling pathways. *PLoS One* 2(8):e789. doi:10.1371/journal.pone.0000789. Online verkrijgbaar van <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1949143>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, Michael LF, Pulgserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby L, Spiegelman BM. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801. doi:10.1038/nature00904
- Lippolis JD, Reinhardt TA. 2008. Proteomics in animal science. *Journal of Animal Science* 86:2430-2441. doi:10.2527/jas.2008-0921
- MacArthur DG, Seto JT, Raftery JM, Quinlan KG, Huttley GA, Hook JW, Lemckert FA, Kee AJ, Edwards MR, Berman Y, Hardeman EC, Gunning PW, Easteal S, Yang N, North KN. 2007. Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nature Genetics* 39:1261-1265. doi: 10.1038/ng2122.
- Mancheño-Corvo P, Martín-Duque P. 2006. Viral gene therapy. *Clinical and Translational Oncology* 8:858-867. doi:10.1007/s12094-006-0149-y
- Mandel RJ, Burger C, Snyder RO. 2007. Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: Properties and clinical grade production. *Experimental Neurology* 209:58-71. doi:10.1016/j.expneurol.2007.08.008
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405:1066-1069. doi:10.1038/35016604
- Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R. 2007. Animal transgenesis: state of the art and applications. *Journal of Applied Genetics* 48:47-61. Online verkrijgbaar van http://jag.igr.poznan.pl/2007-Volume-48/1/pdf/2007_Volume_48_1-47-60.pdf. Toegang verkregen 9 april 2009
- Motlík J, Klíma J, Dvořánková B, Smetana K. 2007. Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology* 67:105-111. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.018

- MSNBC. 2006. Cloneburgers, Anyone? Farmer Can't Wait. Redmond WA: MSNBC. Online verkrijgbaar van <http://www.msnbc.msn.com/id/16288048/>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Nexia. 2009. Technology, Products. Montreal: Nexia. Online verkrijgbaar van http://www.nexiabiotech.com/en/01_tech/01.php. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Niemann H, Kues W, Carnwath JW. 2005. Transgenic farm animals: present and future. *OIE Revue Scientifique et Technique* 24:285-298.
- Nienhuis AW. 2006. Assays to evaluate the genotoxicity of retroviral vectors. *Molecular Therapy* 14:459-460. doi:10.1016/j.ymthe.2006.08.003
- Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. 2006. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Molecular Therapy* 13:1031-1049. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.001
- Paula LE. 2001. Biotechnologie bij Dieren Ethisch Getoetst? Een Onderzoek naar het Functioneren van het Besluit Biotechnologie bij Dieren. Werkdocument 84. Den Haag: Rathenau Instituut.
- Pinkert CA, Galbreath EJ, Yang CW, Striker LJ. 1994. Liver, renal and subcutaneous histopathology in PEPCK-bGH transgenic pigs. *Transgenic Research* 6:401-405. doi:10.1007/BF01976771
- Pursel VG, Mitchell AD, Bee G, Elsasser TH, McMurtry JP, Wall RJ, Coleman ME, Schwartz RJ. 2004. Growth and tissue accretion rates of swine expressing an insulin-like growth factor I transgene. *Animal Biotechnology* 15: 33-45. doi:10.1081/ABIO-120029812
- Pursel VG, Wall RJ, Solomon MB, Bolt DJ, Murray JE, Ward KA. 1997. Transfer of an ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion gene into swine. *Journal of Animal Science* 75:2208-2214.
- Ren X, Tahimic CGT, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M. 2006. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: New prospects for gene delivery. *Stem Cell Reviews* 2:43-50. doi:10.1385/SCR:2:1:43
- Renard J-P, Chastant S, Chesné P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X. 1999. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353(9163):1489-1491. doi:10.1016/S0140-6736(98)12173-6
- Renard J-P, Maruotti J, Jouneau A, Vignon X. 2007. Nuclear reprogramming and pluripotency of embryonic cells: Application to the isolation of embryonic stem cells in farm animals. *Theriogenology* 68 (Suppl. 1):S196-S205. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.060
- Revivacor. 2009. Xenotransplantation Program. Blacksburg VA: Revivacor. Online verkrijgbaar van http://www.revivacor.com/body_xenotransplantation.htm. Toegang verkregen op 9 april 2009

- Reyes-Sandoval A, Harty JT, Todryk SM. 2007. Viral vector vaccines make memory T cells against malaria. *Immunology* 121:158-165. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02552.x
- Roberts J, Teale P, Kay R, Creaser CS, Rees RC, Ball G, Mian S, Goldspink G, Harridge S .2004. The Application of Cellular Chemistry and Proteomic Approaches to the Detection of Gene Doping. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Gene_Dr_Roberts_C6.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Rupert J, McKenzie D. 2005. Development of a Prototype Blood-Based Test for Exogenous Erythropoietin Activity Based on Transcriptional Profiling. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Pr-Rupert.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 46:527–539. doi:10.1016/0093-691X(96)00174-4
- Schnieke AE, Kind AJK, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130–2133. doi:10.1126/science.278.5346.2130
- Schonfelder P, Schulz T, Mueller K, Grucza R. 2006. Comparative Gene Expression Profiling in Human Buccal Epithelium and Leukocytes after the Abuse of Beta-2-Agonists and Anabolic Steroids. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/06B17HM_Schoenfelder.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Segura J, Pascual J, Nikolovski Z, Andreu D, de la Torre BG, Fillat C, Martinez-Miralles E, Llop J, Gispert JD. 2006. IMAGENE: Non-Invasive Molecular Imaging of Gene Expression Useful for Doping Control: Extension Study in Animals After Erythropoietin Gene Transfer. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Segura_Gene_2006.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Simon P, Lauer UM, Bitzer M. 2006. Sensitivity and Specificity of a Gene Doping Test Detecting Transgenic DNA on a Single Molecule Level in Peripheral Blood Probes. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Simon_2006_2.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Sinclair KD, McEvoy TG, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Broadbent PJ, Robinson JJ. 1999. Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *Journal of Reproduction Fertility* 116:177–186. doi:10.1530/jrf.0.1160177
- Snyder RO, Mouillier P. 2006. A Pilot Study to Develop a Reliable Blood Test for the Detection of Gene Doping after Intramuscular Injection of Naked Plasmid DNA. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/R06D01RS_Snyder.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009

- Staun J. 2006. Can Gene Doping be Detected? (June 22, 2006). Aarhus: Play the Game. Online verkrijgbaar van <http://www.playthegame.org/knowledge-bank/articles/can-gene-doping-be-detected.html>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Stinnakre MG, Vilotte JL, Soulier S, Mercier JC. 1994. Creation and phenotypic analysis of alpha-lactalbumin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:6544-6548. doi:10.1073/pnas.91.14.6544
- Sundt-Hansen L, Sundström LF, Einum S, Hindar K, Fleming IA, Devlin, RH. 2007. Genetically enhanced growth causes increased mortality in hypoxic environments. *Biology Letters* 3:165-168. doi:10.1098/rsbl.2006.0598
- Thevis M, Tonevitsky A, Schanzer W. 2006. Analysis of Growth Hormone Isoform Profiles in Human Plasma using Proteomics Strategies. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Thevis_2006.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Tizard MLV, Moore RJ, Lambeth LS, Lowenthal JW, Doran TJ. 2007. Manipulation of small RNAs to modify the chicken transcriptome and enhance productivity traits. *Cytogenetic and Genome Research* 117:158-164. doi:10.1159/000103176.
- Universiteit van Guelph .2009. Guelph Transgenic Pig Research Program. Guelph: Universiteit van Guelph. Online verkrijgbaar van <http://www.uoguelph.ca/enviropig/>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Vajta G, Gjerris M. 2006. Science and technology of farm animal cloning: State of the art. *Animal Reproduction Science* 92:211-230. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.12.001
- Van de Lavoie MC, Mather-Love C. 2006. Avian embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* 418(Embryonic Stem Cells):38-64. doi:10.1016/S0076-6879(06)18003-9
- Vandersteen Tymchuk WE, Abrahams MV, Devlin RH 2005. Competitive ability and mortality of growth-enhanced transgenic coho salmon fry and parr when foraging for food. *Transactions of the American Fisheries Society* 134:381-389. doi:10.1577/T04-084.1
- Van Laere A-S, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L. 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 425:832-836. doi:10.1038/nature02064
- Van Reenen CG, Blokhuis HJ. 1997. Evaluation of welfare of transgenic animals; lessons from a case study in cattle. *Kunglige Skogs och Lantbruksakademiens Tidskrift* 20(Transgenic animals and food production):99-105.

- Van Reenen CG, Meuwissen TH, Hopster H, Oldenbroek K, Kruip TH, Blokhuis HJ. 2001. Transgenesis may affect farm animal welfare: a case for systematic risk assessment. *Journal of Animal Science* 79:1763-1779.
- Van Weel V, Deckers MM, Grimbergen JM, Van Leuven KJ, Lardenoye JH, Schlingemann RO, Van Nieuw Amerongen GP, Van Bockel JH, Van Hinsbergh VW, Quax PH. 2004. Vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic skeletal muscle enhances myoglobin expression in vivo. *Circulation Research* 95:58-66. doi:10.1161/01.RES.0000133247.69803.c3
- Viagen. 2006a. Top Barrel Racing Champion Horse “Scamper” Cloned. ViaGen Reproduces the Horse that Made Charmayne James Famous (Press Release 15 November 2006). Austin TX: Viagen. Online verkrijgbaar van <http://www.viagen.com/top-barrel-racing-champion-horse-scamper-cloned/>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Viagen. 2006b. Top Cutting Horse “Royal Blue Boon” First Mare to Ever Be Cloned. ViaGen, Encore Launch International Horse Cloning Business with Announcement of Several Famous Mare Clones (Press Release 30 March 2006). Austin TX: Viagen. Online verkrijgbaar van <http://www.viagen.com/first-two-commercially-cloned-us-horses-thriving/>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- WADA. 2007. WADA-Sponsored Research Projects: Gene and Cellular Technologies applied to Sports. Montreal: World Anti-Doping Agency. Online verkrijgbaar van <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=347>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Walsh G. 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology* 24:769-776. doi:10.1038/nbt0706-769
- Wang Y-X, Zhang C-L, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biology* 2(10):e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294. Online verkrijgbaar van <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=509410>. Toegang verkregen op 9 april 2009.
- Wanke R, Hermanns W, Folger S, Wolf E, Brem G. 1991. Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview. *Pediatric Nephrology* 5:513-521. doi:10.1007/BF01453693
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813. doi:10.1038/385810a0
- Wolf E, Kahnt E, Ehrlein J, Hermanns W, Brem G, Wanke R. 1993. Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mechanisms of Ageing And Development* 68:71-87. doi:10.1016/0047-6374(93)90141-D

Wolinsky H. 2007. The thousand-dollar genome. Genetic brinkmanship or personalized medicine?
EMBO Reports 8:900-903. doi:10.1038/sj.embor.7401070

Wu S-L, Amato H, Biringer R, Choudhary G, Shieh P, Hancock WS. 2002. Targeted proteomics of low-level proteins in human plasma by LC/MSn: using human growth hormone as a model system.
Journal of Proteome Research 1:459-465. doi:10.1021/pr0255371

Yang J, Zhao B. 2006. Effects of enhanced muscle mass on body fat deposition and insulin sensitivity.
FASEB Journal 20:A168.

Zeng L, Rahrman E, Hu Q, Lund T, Sandquist L, Felten M, O'Brien TD, Zhang J, Verfaillie C. 2006.
Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. Stem Cells 24:2355- 2366.
doi:10.1634/stemcells.2005-0551

Annex I Overzicht van de EU-wetgeving over GGO's

Sinds het begin van de jaren negentig is er specifieke EU-wetgeving over GGO's. De EU heeft specifieke GGO-wetgeving ontwikkeld om de gezondheid van de burger en het milieu te beschermen en tegelijkertijd een geharmoniseerde markt voor biotechnologie tot stand te brengen.

Geselecteerde teksten:

- Richtlijn 90/219/EEG, gewijzigd bij Richtlijn 98/81/EG, inzake het ingeperkte gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen (GGM's) legt beperkende voorwaarden op voor het werken met GGM's bij onderzoek, in de industrie of in laboratoria. Publicatieblad van de Europese Unie L 117 (8.5.1990), 1-14. Online verkrijgbaar van <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/nl/consleg/1990/L/01990L0219-20050305-nl.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Richtlijn 2001/18 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu is een 'horizontale' richtlijn met voorschriften voor experimentele introducties en het in de handel brengen van GGO's. Publicatieblad van de Europese Unie L 106 (17.4.2001), 1-39. Online verkrijgbaar van <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/nl/consleg/2001/L/02001L0018-20031107-nl.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Verordening 1829/2003 inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders bevat voorschriften voor het in de handel brengen van levensmiddelen en diervoeders die geheel of gedeeltelijk bestaan uit GGO's en voor de etikettering van dergelijke producten ten behoeve van de eindgebruiker. Publicatieblad van de Europese Unie L 286 (18.10.2003), 1-23. Online verkrijgbaar van <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/nl/consleg/2003/R/02003R1829-20070112-nl.pdf>. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Verordening 641/2004 tot vaststelling van nadere bepalingen ter uitvoering van Verordening (EG) nr. 1829/2003. Publicatieblad van de Europese Unie L 102 (7.4.2004), 14-25. Online verkrijgbaar van http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/nl/oj/2004/l_102/l_10220040407nl00140025.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009
- Verordening 1830/2003 betreffende de traceerbaarheid en etikettering van GGO's en de traceerbaarheid van met GGO's geproduceerde levensmiddelen en diervoeders introduceert een geharmoniseerd EU-systeem om GGO's te traceren en te etiketteren en om met GGO's geproduceerde levensmiddelen en diervoeders te traceren. Publicatieblad van de Europese Unie L 268 (18.10.2003), 24-28. Online verkrijgbaar van http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/nl/oj/2003/l_268/l_26820031018nl00240028.pdf. Toegang verkregen op 9 april 2009